

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **L. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

**Gab. BERTRAND, E. LECLAINCHE, L. MARTIN,
F. MESNIL, G. RAMON,**

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur.

Secrétaire de la Rédaction : A. BOQUET.

TOME SOIXANTIÈME

Janvier-Juin 1938

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

QR

1

A475

v. 60

Jan.-June

1938

PER

PARIS. — ANC^{ve} IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1938.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

DE LA NATURE DE L'IMMUNITÉ ACQUISE VIS-A-VIS DE L'ÉPITHÉLIOMA CHEZ LE LAPIN

par A. BESREDKA et L. GROSS.

Le problème de l'immunité vis-à-vis des tumeurs néoplasiques a fait l'objet d'innombrables publications, souvent contradictoires. Nous n'en retenons ici que le seul fait sur lequel il y a unanimité des auteurs, celui qui a trait à l'immunité acquise vis-à-vis de la propre tumeur après que celle-ci a subi une régression suivie de résorption.

Quant à l'immunité passive, conférée par le sérum des animaux naturellement réfractaires ou des animaux ayant résorbé leurs tumeurs, elle a donné également lieu à des affirmations bien divergentes. Il serait beaucoup trop long de les résumer ici, même brièvement ; nous nous contenterons de rappeler que ce furent Lumsden, Leyden et Blumenthal, Jensen, Rohdenburg, Bittman et Goldfeder et d'autres, qui expérimentèrent sur le sérum des animaux ayant reçu, en injections, des tumeurs de chien, de rat ou de souris. Haaland, Kross s'adressèrent au sérum des animaux naturellement réfractaires vis-à-vis de certaines tumeurs. D'autres expérimentateurs essayèrent le sérum des animaux ayant résisté à une première inoculation (G. L. Rohdenburg et d'autres) ; plusieurs auteurs étudièrent le sérum des animaux réceptifs, opérés après l'apparition de la tumeur ; ces expériences

eurent pour auteurs Uhlenhuth, Collier et Cohn, et d'autres.

Plusieurs savants, tels que Rous, Kross, Morpurgo, ont mis en état de parabiose des animaux *naturellement* réfractaires avec des animaux réceptifs ; éprouvés dans la suite, ces animaux se trouvèrent exactement dans le même état de réceptivité ou d'immunité qu'avant l'opération.

Enfin, un certain nombre d'expérimentateurs portèrent leurs recherches sur le sérum des animaux ayant acquis une immunité solide à la suite de la résorption de leur tumeur. Sur cette question, également, les avis sont divisés. Kross, de même que Rous et Murphy, refusent à de tels sérums tout pouvoir spécifique ; ces derniers se basent sur leurs recherches, bien connues, relatives au sarcome des poules. Par contre, Clowes et ses collaborateurs estiment que le sérum des animaux en possession d'une immunité active est, à son tour, immunisant. Cette opinion est partagée par certains expérimentateurs, tels que Lewin, Sticker, Crile et Beebe, Ito et d'autres.

*
* *

Nos propres expériences relatives à la nature de l'immunité ont porté sur l'épithélioma du lapin de Brown-Pearce. Le choix de cette tumeur nous parut indiqué en raison de la facilité avec laquelle nous sommes parvenus à créer à volonté des tumeurs épithéliomateuses résorbables, donc assurant à nos animaux une immunité très solide.

Rappelons que l'épithélioma du lapin est doué, comme l'avaient montré Brown et Pearce, d'un caractère malin : introduite dans les testicules, cette tumeur ne manque point, dans la majorité des cas, de donner des métastases mortelles ; inoculée sous la dure-mère ou dans la chambre antérieure de l'œil, elle se montre encore plus meurtrière.

Par contre, ce caractère de malignité disparaît, comme nous l'avons décrit antérieurement, dès que l'épithélioma se trouve localisé dans la peau. La résorption d'une telle tumeur intracutanée étant dès lors assurée, nous avons pu avoir à notre disposition autant de lapins solidement immunisés que nous le désirions.

La bénignité des tumeurs intracutanées chez le lapin, d'au-

tant plus significative que nous la retrouvons — nous allons y revenir — chez d'autres espèces animales, nous a engagés à poursuivre l'étude de ces tumeurs. Voici quelques détails observés au cours de différentes expériences, faites depuis notre dernière publication (1).

Sur 68 lapins auxquels l'épithélioma de Brown-Pearce a été introduit dans les testicules, 56 ont succombé avec des métastases multiples dans les organes, ce qui représente une mortalité de 82 p. 100.

Sur 68 lapins injectés sous la peau, 25 ont succombé à des métastases, soit 36,7 p. 100, et 43 ont résorbé leurs tumeurs.

Sur 100 lapins inoculés dans la peau, 6 seulement, soit 6 p. 100, ont eu des métastases. Nous pensons, jusqu'à preuve du contraire, que ces métastases sont imputables soit à des infections favorisées par la localisation des tumeurs à fleur de peau, soit à la pénétration d'une partie des émulsions sous la peau.

C'est donc, de toutes les voies d'inoculation, la voie intracutanée qui est la plus inoffensive (2).

Comme nous l'avons déjà fait ressortir à plusieurs reprises, les lapins ayant résorbé leurs tumeurs — quel que soit le siège de ces dernières — deviennent réfractaires à la réinoculation de la même tumeur (3).

Jamais, au cours de nos expériences, nous ne rencontrâmes

(1) Ces *Annales*, 57, 1936, p. 343.

(2) Pour ce qui est de la réceptivité des muqueuses, nous avons fait une seule expérience sur deux lapins inoculés dans la muqueuse buccale. Deux tumeurs caractéristiques ont apparu en temps ordinaire ; puis elles se sont résorbées. Réinoculés ultérieurement dans la peau et dans le péritoine, ces animaux ne réagirent plus.

(3) Un seul lapin ne se montra pas immunisé après la résorption de sa tumeur. Voici son histoire :

Le 9 avril, il lui a été injecté dans la peau, en deux points, une émulsion de tumeur épithéliomateuse. Après le délai habituel de cinq à six jours, on vit apparaître deux tumeurs intracutanées caractéristiques. Le 15 avril, on injecta, à l'occasion d'une autre expérience, à ce même lapin, dans la peau, du côté opposé, 1 c. c. 5 de toxine diphtérique, diluée à 1/30.000 : une très forte réaction cutanée s'ensuivit.

Les tumeurs intracutanées continuèrent à évoluer, pour arriver à atteindre un volume considérable. A un moment donné — ce fut dans le courant du mois de mai, — on sentait, à la palpation, un petit ganglion

de lapins « naturellement réfractaires ». Dans les cas rares où nos animaux ne répondaient pas aux inoculations, cela ne pouvait tenir qu'à la faible virulence de la tumeur employée : car ces mêmes lapins contractaient, lors de la réinoculation, des tumeurs typiques dont l'évolution était exactement la même que chez des lapins neufs.

Faisons remarquer ici que, malgré la bénignité pratiquement certaine de l'épithélioma évoluant dans l'épaisseur de la peau, nous avons essayé d'atténuer artificiellement la virulence de notre tumeur par différents procédés, en vue d'une immunisation éventuelle des lapins.

Des fragments d'épithélioma furent portés à la glacière (à 0° C.) et y laissés, suivant les cas, de deux à dix-huit jours. Injectés ensuite à des lapins neufs, ces fragments ont produit, dans la grande majorité des cas (20 cas positifs sur 26 inoculés), des tumeurs caractéristiques et des métastases. Au-delà de ce délai, soit après un séjour à la glacière pendant vingt et un, trente et un et quarante jours, les tumeurs demeuraient inactives : les lapins ainsi préparés, réinoculés dans la suite avec des émulsions d'épithélioma virulent, contractaient des tumeurs, tout comme des lapins neufs.

L'addition de bile ou de glycérine à des tumeurs virulentes privait celles-ci de leur pouvoir pathogène ; mais, ces tumeurs, devenues avirulentes, n'immunisaient pas.

Il en fut de même des tumeurs soumises à des congélations (30° au-dessous de zéro), suivies de décongélations répétées, ou bien laissées à l'étuve (37°-38°) pendant trois, deux ou même un jour.

Les choses se passaient un peu autrement lorsqu'on s'adressait à des tumeurs enfermées dans des sacs de collodion. Sur 16 lapins ayant reçu le contenu de sacs restés dans le péritoine trois, deux ou un jour, deux lapins ayant reçu le contenu de sacs restés vingt-quatre heures dans le péritoine, ont mon-

au niveau de la patte la plus voisine des tumeurs ; vers le 5 juin, les tumeurs se résorbèrent.

Le 25 juin, ce lapin fut inoculé dans les testicules. Le 7 juillet, nous constatâmes, pour une raison qui nous échappe, une tumeur volumineuse dans le testicule et plusieurs métastases dans la cavité abdominale.

tré des tumeurs. Ajoutons que les animaux injectés avec des tumeurs devenues avirulentes, se montraient toujours dépourvus de toute immunité. Ainsi, toutes nos tentatives pour atténuer, ne fut-ce que partiellement, la virulence des tumeurs, dans l'espoir d'en faire des tumeurs-vaccins, ont complètement échoué. L'unique procédé, sûr et inoffensif, qui nous permit de conférer aux lapins une immunité solide, fut donc la vaccination par la voie intracutanée, au moyen d'une tumeur normale n'ayant subi aucune préparation préalable.

*
* *

Quelle est la nature de l'immunité anti-épithéliomateuse ? Cette immunité est-elle susceptible d'être transmise à des animaux neufs ?

Nos expériences ont porté sur le sérum, les hématies, la rate et le cerveau des lapins ayant acquis, à l'égard de l'épithélioma, une immunité très solide ; la résistance de ces lapins était telle que l'on pouvait leur injecter, en n'importe quel point de l'organisme, n'importe quelle quantité de tumeur, sans qu'il s'ensuivît une tumeur.

Sans entrer dans les détails, notons que toutes ces expériences ont donné des résultats uniformes, aussi bien celles qui étaient faites avec des organes qu'avec le sérum. Que nous administrions le sérum la veille de l'émulsion tumorale ou en mélange avec celle-ci, que nous traitions les tumeurs déjà évoluées par instillations intratumorales de sérum, l'effet ne variait guère : en aucun cas nous ne fûmes en mesure de remarquer le moindre effet spécifique, alors même que nous mettions en œuvre des quantités massives de sérum. Voici une de ces expériences :

Le 26 novembre 1936, il est introduit à 3 lapins neufs, sous la peau, 10 à 15 cent. cubes de sérum provenant d'animaux hyperimmunisés contre l'épithélioma ; à 3 autres lapins il est injecté, dans les mêmes conditions, du sérum normal de lapin.

Le lendemain (27 novembre), les 6 lapins reçoivent dans la peau une émulsion de tumeur.

Les trois jours suivants (28, 29, 30 novembre), on continue

à préparer les lapins comme le premier jour. Chaque animal du premier lot a donc reçu, au total, à titre préventif, 45 à 50 cent. cubes de sérum « spécifique », et chaque animal du second lot, la même quantité de sérum normal.

Dans les six à sept jours qui suivirent l'inoculation de l'émulsion épithéliomateuse, on vit apparaître chez tous les 6 lapins, des tumeurs intracutanées caractéristiques, sans que l'on pût saisir la moindre différence entre les unes et les autres.

La même expérience a été répétée sur d'autres lapins avec le même résultat : le sérum des lapins hyperimmunisés vis-à-vis de l'épithélioma se montra donc incapable de conférer la moindre immunité passive à des lapins neufs.

L'effet était le même quand nous laissions pendant 24 heures un fragment d'épithélioma en contact avec du sérum « spécifique » et que nous introduisions ensuite ce fragment dans la peau d'un lapin neuf : quelques jours plus tard, on ne manquait pas d'assister à l'évolution de l'épithélioma, tout comme chez des lapins témoins.

Sans nous décourager par ces résultats négatifs, nous essayâmes de procéder à l'opération de parabiose, laquelle devait offrir, avons-nous pensé, des conditions optima pour la transmission de l'immunité passive, si toutefois celle-ci était possible.

Voici, en quelques lignes, la technique que nous avons suivie. Chaque opération portait sur 2 lapins, 1 neuf et 1 lapin rendu préalablement activement immun, après résorption d'une ou de plusieurs tumeurs intracutanées.

Nous excisions complètement, chez chacun d'eux, un lambeau cutané, large de 8 centimètres et long de 12 à 14 centimètres ; puis, sur toute cette étendue, nous réunissions les muscles par plusieurs points de suture ; nous procédions de même ensuite pour la peau.

Pour nous assurer que, entre les lapins en état de parabiose, les échanges s'accomplissaient normalement, nous injections au lapin immun, sous la peau, soit des bacilles typhiques, soit du sérum antidiphtérique, puis nous cherchions dans le sang du témoin, des agglutinines antityphiques ou de l'antitoxine diphtérique.

Ces expériences ont porté sur 9 couples. La survie après l'opération a été de neuf à vingt et un jours.

Voici une de ces expériences :

Le lapin n° 223 reçoit, le 10 décembre, dans l'épaisseur de la peau, une émulsion de tumeur épithéliomateuse, en trois points différents. Dans la semaine qui suit, on voit apparaître trois tumeurs intracutanées caractéristiques ; ces tumeurs sont résorbées trois semaines plus tard. On injecte à ce lapin, le 21 janvier, pour renforcer son immunité, une émulsion chargée d'épithélioma dans la peau et dans le péritoine. Il ne s'ensuit aucune réaction, comme il fallait s'y attendre. Les 18, 25 et 29 janvier, des bacilles typhiques tués sont injectés à ce lapin sous la peau.

Le 22 janvier, on met ce lapin en état de parabiose avec un lapin neuf de même taille (n° 275). La plaie se cicatrise rapidement. Le 1^{er} février, le sérum du lapin n° 223 agglutine les bacilles typhiques à 1/320 ; celui du lapin n° 275 agglutine à 1/160. Après nous être ainsi assurés que les échanges entre les deux lapins opérés sont bien établis, nous leurs inoculons, le 2 février, dans la peau, une émulsion d'épithélioma.

Dans la semaine qui suit l'inoculation, nous voyons apparaître une tumeur intracutanée typique chez le lapin n° 275, c'est-à-dire chez le lapin non préparé ; le lapin n° 223, immun, demeure intact.

Dans les cas où, pour contrôler l'établissement des échanges, nous injectons au lapin immun de l'antitoxine diphtérique, celle-ci apparaissait très rapidement dans le sang du lapin témoin : on n'avait qu'à injecter, peu de temps après, de la toxine diphtérique dans la peau des deux lapins parabiotiques, pour constater la différence des réactions cutanées chez ceux-ci et chez des lapins témoins.

De l'ensemble de nos expériences sur la parabiose, il ressort avec évidence que, malgré les échanges incontestables qui s'effectuent entre les systèmes circulatoires des deux animaux, chacun d'eux conserve intégralement la réceptivité ou l'immunité, qui lui était propre avant l'opération.

Nous arrivons ainsi à cette conclusion que les lapins qui acquièrent une immunité active à l'égard de la tumeur, ne

renferment dans leur sang aucune trace de principe protecteur spécifique.

Sans préjuger de la nature du facteur cancérigène, qu'il s'agisse d'un virus, d'un virus-protéine ou d'un agent de toute autre nature, ce que nous désirons surtout faire ressortir de nos expériences, c'est que, à la faveur de la vaccination intracutanée, on est en mesure de créer à volonté une immunité extrêmement solide contre l'épithélioma, et que cette immunité active n'est pas transmissible, qu'elle est d'essence uniquement cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BESREDKA (A.) et GROSS (L.). *Ces Annales*, **57**, 1936, p. 343 ; *C. R. Acad. des Sciences*, **202**, 1936, p. 1217 et p. 1626 ; *C. R. Acad. des Sciences*, **204**, 1937, p. 730.
- [2] BESREDKA (A.), MAGAT (I.), LAVAL (P.) et BESNARD (P.). *Ces Annales*, **56**, 1936, p. 125.
- [3] BITTMANN et GOLDFEDER. *Z. f. Krebsf.*, **29**, 1929, p. 147.
- [4] CLOWES (G. H. A.), GAYLORD et BAESLACK. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **16**, 1906, p. 130 ; *Amer. J. Cancer*, **15**, 1931, p. 563.
- [5] COLLIER et COHN. *Z. f. Krebsf.*, **35**, 1932, p. 641.
- [6] CRILE et BEEBE. *Journ. Med. Res.*, **18**, 1908, p. 385.
- [7] HAALAND. *Berl. kl. Woch.*, **44**, 1907, p. 717.
- [8] ITO. *Gann*, **25**, n° 3, p. 141.
- [9] JENSEN. *Z. Bakt.*, **34**, 1903, p. 30, et *Z. f. Krebsf.*, **7**, 1909, p. 281.
- [10] LEWIN (C.). *Med. Kl.*, n° 31, 1922, p. 983.
- [11] VON LEYDEN et BLUMENTHAL. *Deutsch. med. Woch.*, **28**, 1902, p. 637.
- [12] ROUS (P.) et MURPHY (J. B.). *J. Exp. Med.*, **20**, 1914, p. 419.
- [13] ROHDENBURG (G. L.). *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **14**, 1916-17, p. 167.
- [14] STICKER. *Z. f. Krebsf.*, **4**, 1906, p. 227, et *Z. Bakt.*, **104**, 1927, p. 48.
- [15] UHLENHUTH. *Med. Kl.*, n° 37, 1912, p. 1496.

RECHERCHES
SUR LE PHÉNOMÈNE DE TWORT-D'HÉRELLE
(BACTÉRIOPHAGIE
OU AUTOLYSE HÉRÉDO-CONTAGIEUSE)

[CINQUIÈME MÉMOIRE (1)]

Par E. WOLLMAN et M^{me} E. WOLLMAN.

En dehors de l'intérêt propre que présente l'étude de l'autolyse transmissible (2) dans ses diverses manifestations, les recherches poursuivies dans ce domaine ont beaucoup contribué à faire envisager une notion nouvelle, d'une importance capitale : celle de processus infectieux non microbiens. Dès le début, en effet, le problème de la bactériophagie a été dominé par la question de savoir si les agents de ce processus étaient des ultravirus authentiques, c'est-à-dire des êtres vivants autonomes, des inframicrobes, ou bien des éléments produits (et reproduits) par les cellules bactériennes elles-mêmes.

Dans les mémoires précédents nous avons montré qu'il existe actuellement, en faveur de cette dernière manière de voir, un faisceau de présomptions extrêmement important sans qu'on puisse parler, toutefois, de preuves irréfutables. On a pu croire, à diverses reprises, tenir de telles preuves, mais toujours surgissaient de nouveaux faits qui diminuaient la portée des résultats invoqués.

Il en a été ainsi, notamment, des belles expériences de Den Dooren de Jong (3). Le savant hollandais, rappelons-le,

(1) Ces *Annales*, **39**, 1925, p. 739 ; **41**, 1927, p. 883 ; **49**, 1932, p. 41 ; **56**, 1936, p. 137.

(2) Comme dans le mémoire précédent, nous emploierons indifféremment, au cours de cet exposé, les termes « bactériophagie », « autolyse transmissible » ou « autolyse hérédéo-contagieuse » et ceux de « bactériophages » ou de « facteurs lysogènes » pour désigner les éléments actifs.

(3) *Zentralbl. f. Bakt. I.*, **120**, 1931, p. 1 et 15 ; **122**, 1931, p. 277 ; **131**, 1934, p. 401.

avait montré que chez les bacilles sporulés spontanément lysogènes, la fonction lysogène subsistait en entier dans les cultures issues de spores chauffées à 100°. Les bactériophages correspondants étant détruits à 70°-75°, leur présence dans les cultures provenant de spores chauffées ne pouvait s'expliquer, semblait-il, que par une production *de novo* de ces éléments. L'origine endogène de ceux-ci paraissait enfin établie.

Bientôt pourtant, ainsi que nous le rappelons dans notre dernier mémoire, les travaux de Cowles (4) et d'Adant (5) montrèrent qu'on pouvait obtenir des résultats superposables avec des germes non lysogènes expérimentalement « contaminés » par le bactériophage correspondant. Nous avons pu confirmer et étendre ces données (6).

On fait sporuler le *B. subtilis* en présence du bactériophage correspondant ; on peut ensuite chauffer les spores à 90° pendant quarante minutes ou bien les soumettre à des pressions atteignant 14.000 atmosphères sans que la fonction lysogène soit atteinte, alors que les facteurs lysogènes à l'état libre sont détruits par un chauffage à 70°-75°, ou une pression de 7.000 atmosphères. Les spores de germes expérimentalement « contaminés » par le bactériophage correspondant, tout comme celles des germes spontanément lysogènes, gardent donc leur fonction lysogène lorsqu'on les expose à des actions qui détruisent sûrement les facteurs lysogènes libres. Il était logique de penser que le mécanisme de cette protection était le même dans les deux cas. Or, les expériences de Vedder (7) avaient montré qu'à l'état desséché, les bactériophages supportent impunément la température de 100° ; on pouvait donc penser que ces éléments se trouvaient, dans le protoplasme déshydraté des spores, à l'abri des agents nocifs. Aussi, avons-nous conclu, dans notre dernier mémoire, que dans le cas des germes lysogènes, comme dans celui des bactéries expérimentalement « contaminées », les facteurs lysogènes qu'on trouvait dans les cultures issues de spores chauffées (ou pressées)

(4) *Journ. Bact.*, **22**, 1931, p. 121.

(5) *C. R. Soc. Biol.*, **111**, 1932, p. 1055.

(6) J. BASSET, E. WOLLMAN, M^{me} WOLLMAN et M. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sc.*, **200**, 1935, p. 1072 ; ces *Annales*, **56**, 1936, p. 137.

(7) *Zentralbl. f. Bakteriol.*, **125**, 1932, p. 111.

pouvaient fort bien provenir de facteurs lysogènes préexistants (8) : la question de leur origine restait entière.

Or, les choses sont en réalité moins simples et la conclusion que nous venons de rappeler semble devoir être révisée. On admet, en effet, implicitement, dans les recherches sur la bactériophagie, que les corpuscules bactériophages peuvent être contenus, comme tels, à l'intérieur des cellules bactériennes. L'interprétation erronée de certains résultats expérimentaux parfaitement exacts en eux-mêmes nous a fait, à un moment donné, adopter cette façon de voir. Par la suite (9), nous avons pu nous assurer que, même à l'état végétatif, on ne décèle pas, chez les bactéries lysogènes, de corpuscules bactériophages intracellulaires ; il en est de même, du reste, de bactéries non lysogènes « contaminées » par leur bactériophage. Nous étudierons, au cours de ce travail, la portée de ces faits, portée que nous avons déjà indiquée ailleurs (10). Qu'il nous suffise de dire, pour le moment, qu'ils paraissent rétablir les résultats de Den Dooren de Jong dans leur signification première. Il nous faut reprendre, en effet, l'étude des rapports quantitatifs entre bactéries et bactériophages que nous avons abordée dans notre dernier mémoire et qui a fait, depuis, l'objet d'un travail de Gratia (11).

I. — Rapports quantitatifs entre Bactéries lysogènes (*B. megatherium* 899) et Bactériophages.

Dès 1932 (12) nous attirions l'attention sur ce fait curieux que le titre bactériophagique d'un lysat est, d'une façon générale, très sensiblement de même ordre que le titre

(8) Reprenant l'étude de cette question, Gratia écrit (ces *Annales*, **57**, 1936, p. 674) : « Pourquoi la spore refuserait-elle au protoplasme du virus bactériophage la protection qu'elle accorde au protoplasme du microbe ? Heureusement, on doit à Cowles et à Adant d'avoir réconcilié la logique avec les faits. » Nous sommes, sur ce dernier point, d'accord avec Gratia. On verra, toutefois, que cela ne semble guère être dans le sens où l'entend cet auteur.

(9) *C. R. Soc. Biol.*, **122**, mai 1936, p. 190.

(10) *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 1937, p. 931.

(11) Ces *Annales*, **57**, décembre 1936, p. 652.

(12) Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 41.

bactérien de la suspension qui lui avait donné naissance. Autrement dit, le nombre de facteurs lysogènes contenus dans une unité de volume est approximativement le même que celui de bactéries existant dans ce volume avant la lyse. Cette relation ne s'expliquait guère dans l'hypothèse diastatique et était bien faite pour surprendre dans celle d'un virus parasite. En admettant, avec celle-ci, que la lyse était due à l'envahissement des bactéries par un virus et à la pullulation de celui-ci aux dépens des cellules bactériennes, on devait s'attendre à ce que le titre bactériophagique fût un multiple très élevé du titre bactérien de la suspension lysée. Or, l'expérience montre, nous venons de le dire, que ces deux chiffres sont très sensiblement égaux.

Il était particulièrement intéressant d'étudier le rapport quantitatif existant entre bactéries et bactériophages dans le cas de germes spontanément lysogènes. On sait que pour les partisans de la théorie parasitaire, il s'agirait d'une symbiose entre virus bactériophages et bactéries devenues résistantes. Dans le cas d'un gros bacille comme le *B. megatherium*, le rapport des volumes des bactéries et des corpuscules bactériophages est de l'ordre de 1.000.000 à 1 (13). On s'attendrait donc, dans l'hypothèse du virus, à ce que chaque bacille soit porteur de très nombreux corpuscules bactériophages symbiotes. Or, ici encore, l'expérience montre qu'il n'en est rien.

En effet, en dissolvant au moyen du lysozyme du blanc d'œuf une suspension, en eau physiologique, de *B. megatherium* et en éprouvant le lysat obtenu en présence de la variété sensible (mutilat), on constate que le nombre de plages produites est sensiblement égal au nombre de colonies fournies par la même suspension, avant traitement par le lysozyme. Or, ce lysozyme, qui dissout le *B. megatherium*, est dépourvu

(13) La longueur du *B. megatherium* varie de $3,3\ \mu$ à $5,5\ \mu$; son diamètre transversal de $1,3\ \mu$ à $1,6\ \mu$. En assimilant son volume à celui d'un cylindre, il serait compris entre $4,3\ \mu^3$ et $11\ \mu^3$. Celui du bactériophage correspondant serait de $20.000\ m\mu^3$ environ en acceptant pour son diamètre la valeur de 30 à $40\ m\mu$ d'après Levaditi, Païc, Voet et Krassnoff (*C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 334). — Tang, Elford et Galloway (*Br. Journ. Exp. Med.*, **48**, 1937, p. 269), indiquent, pour ce bactériophage, les valeurs de 30 à $37\ m\mu$ (centrifugation) ou de 30 à $45\ m\mu$ (ultrafiltration).

de toute action sur le bactériophage de celui-ci. Le nombre de plages correspond donc au nombre de bactériophages contenus dans la suspension bactérienne. « Nous voilà loin », écrivions-nous dans notre dernier mémoire, « des résultats que semblait faire prévoir la théorie parasitaire et d'après lesquels le premier de ces nombres aurait dû être un multiple plus ou moins élevé du second. L'écart entre le rapport fourni par l'expérience et celui que semblait faire prévoir la théorie parasitaire devient encore plus grand du fait que le *B. megatherium* forme des chaînettes de longueur variable. »

Ce résultat fondamental, d'après lequel le nombre de facteurs lysogènes fourni, après action du lysozyme, par les suspensions de *B. megatherium*, est de même ordre (généralement légèrement en-dessous) que le nombre de bactéries dissoutes, a été confirmé, depuis, au cours de très nombreuses expériences.

Nous allons confronter nos données sur ces « relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bactériophage », avec celles qu'apporte sur cette question un travail récent de Gratia (14).

Déjà antérieurement (13), reprenant nos expériences, Gratia avait cru constater « l'intervention de causes d'erreur » tenant, notamment, à ce que le *B. megatherium* forme des chaînettes, ainsi qu'à la présence des spores, lesquelles, résistantes au lysozyme, pouvaient donner lieu à des erreurs en faisant prendre pour des plages de lyse vraie (bactériophages) des zones de lyse entourant de petites colonies de *B. megatherium*.

Dans son nouveau travail et à la suite de la réponse faite par l'un de nous, Gratia, tout en faisant des réserves au sujet de la signification du facteur « chaînettes », reconnaît que le facteur « spores » n'intervenait pas dans les conditions de nos expériences (16). « Mais alors », poursuit Gratia, « si l'on

(14) Ces *Annales*, **57**, 1936, p. 652.

(15) Ces *Annales*, **56**, 1936, p. 307.

(16) Il est important de s'assurer que ces conditions sont identiques d'une expérience à l'autre. Nous avons, par la suite, eu affaire à des souches de *B. megatherium* dont l'une sporulait déjà après dix heures d'étuve, alors que d'autres étaient devenues, pratiquement, asporogènes.

fait abstraction du facteur « spore », on constate que dans mes expériences on ne trouve plus la relation numérique de M. et M^{me} Wollman et je suis donc en désaccord non seulement sur l'interprétation, mais encore sur le fait lui-même ». Et plus loin : « Malheureusement, je n'ai pu vérifier aucune des données de M. et M^{me} Wollman rappelées ci-dessus. »

Nous avouons ne guère comprendre cette conclusion. Il y a d'abord « le fait lui-même » : c'est la relation numérique existant entre bactéries lysogènes et bactériophages qui faisait l'objet de notre note (17) et que nous avons confirmée dans notre mémoire [alinéa 9 de nos conclusions] (18) : « Sous l'action du lysozyme, les suspensions de *B. megatherium* cultivé sur gélose mettent en liberté, dans les conditions de nos expériences, autant d'éléments actifs (bactériophages) qu'elles donnent de colonies par ensemencement avant ce traitement ».

Or, dans une note antérieure (19), Gratia écrit : « Si, à partir d'une culture de dix heures, on fait un prélèvement suffisant pour réaliser une émulsion légèrement trouble, on constate que le nombre de taches et le nombre de colonies sont sensiblement équivalents. »

Ce sont là, précisément, les conditions de nos expériences et c'est exactement notre résultat, alors que le facteur « spores » n'entre pas en jeu. Gratia retrouve donc bien, malgré l'absence des spores, cette fois, « la relation numérique de M. et M^{me} Wollman ». « Le fait lui-même » est ainsi amplement confirmé.

Bien plus, dans son premier travail, Gratia affirme qu'« il suffit de faire l'expérience non plus avec une culture de vingt heures, mais avec une culture qui a été repiquée une série de fois toutes les quatre ou cinq heures » ne contenant pas de spores « pour voir cette relation numérique s'évanouir » (20).

Il paraissait évident, en effet, qu'en éliminant les fausses plages dues à la persistance des spores, le nombre de taches, réduit à celui de plages de lyse vraie, se trouverait diminué.

(17) *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 47.

(18) *Ces Annales*, **56**, 1936, p. 137.

(19) *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 812.

(20) *Ces Annales*, **56**, p. 315.

Or, ainsi que l'a montré l'un de nous dans sa réponse à Gratia (21), c'est précisément avec des cultures très jeunes que le nombre de plages obtenues sous l'action du lysozyme est le plus élevé : il représente dix fois environ celui des colonies. En tenant compte de la disposition en chaînettes de 10 éléments environ, le nombre de bactériophages se trouve être, dans ces conditions, très sensiblement égal à celui de bactéries.

Dans le travail actuel, Gratia confirme, également, cette donnée si manifestement en contradiction avec l'affirmation contenue dans son article antérieur (22). L'accord sur les faits est donc jusqu'ici tout à fait satisfaisant. Mais pour Gratia, la teneur en bactériophage (libre) du *B. megatherium* est une notion tout à fait contingente et dépend de l'âge et du mode de préparation des suspensions. Avec des suspensions épaisses, par exemple, Gratia trouve un nombre de bactériophages inférieur à celui des colonies, cette proportion pouvant être renversée, nous venons de le voir, dans le cas de suspensions moyennes de cultures jeunes.

L'expérience suivante montre que les résultats sont sensiblement les mêmes, qu'on fasse agir le lysozyme sur des suspensions épaisses ou légères de *B. megatherium*.

EXPÉRIENCE. — Avec des cultures de dix-huit heures (dont treize heures d'étuve) de *B. megatherium*, on fait deux suspensions. L'une (« totale » d'après Gratia) avec la totalité d'une culture sur gélose inclinée dans 9 cent. cubes d'eau physiologique, l'autre « partielle » avec un peu d'une telle culture prélevé sur la partie supérieure de la gélose. La suspension « partielle » donne un trouble très légèrement plus fort que celui qu'on obtient avec III gouttes de suspension « totale » dans 9 cent. cubes d'eau physiologique ; elle représente donc à peu près $1/70$ de celle-ci.

A. La suspension « totale » est additionnée de lysozyme : 1° telle quelle ; 2° après dilution à 10^{-1} ; 3° après dilution à 10^{-2} ; 4° après dilution à 10^{-3} . Après lyse, ces dilutions sont éprouvées sur boîtes de Petri en présence de la variété sensible (mutilat).

Résultats. — 1° Suspension « totale » + lysozyme donne à 10^{-4} : lyse complète ; à 10^{-5} : ± 700 plages ; à 10^{-6} : 70 plages.

(21) Ces *Annales*, **56**, 1936, p. 322.

(22) D'après Gratia, avec ces cultures très jeunes la proportion de bactériophages pourrait représenter de dix à cent fois le nombre de colonies. Nous n'avons pu constater des écarts aussi considérables, mais ils pourraient s'expliquer par la très grande fragilité des bacilles des jeunes cultures.

2° Suspension « totale » à 10^{-1} + lysozyme donne à 10^{-3} : lyse complète ; 10^{-4} : ± 750 plages ; 10^{-5} : 70 plages.

3° Suspension « totale » à 10^{-2} + lysozyme donne à 10^{-2} : lyse complète ; 10^{-3} : ± 700 plages ; 10^{-4} : 65 plages.

4° Suspension « totale » à 10^{-3} + lysozyme donne à 10^{-1} : lyse complète ; à 10^{-2} : ± 600 plages ; à 10^{-3} : 70 plages.

On voit que pour la suspension « totale » en eau physiologique, les résultats sont identiques, qu'on ait fait agir le lysozyme sur la suspension épaisse initiale ou sur ses dilutions successives ; les résultats sont indépendants de la densité des suspensions.

B. La suspension « partielle » en eau physiologique est additionnée de lysozyme en même temps que le reste de la culture suspendue dans 9 cent. cubes d'eau physiologique et qui correspond en réalité, à très peu de chose près, à une suspension « totale ». Voici les résultats obtenus :

A. Suspension « partielle » :

1° A une dilution correspondant à 10^{-5} de la suspension « totale » : lyse presque complète.

2° A 10^{-6} de celle-ci : 2.200 plages.

3° A 10^{-7} de celle-ci : 240 plages.

B. Suspension « totale » :

1° A 10^{-5} : lyse presque complète.

2° A 10^{-6} : 1.300 plages.

3° A 10^{-7} : 148 plages.

Il n'y a donc pas de différence sensible dans la teneur en bactériophages entre les suspensions « totale » et « partielle » faites à partir d'une seule et même culture.

Il n'en est pas moins vrai, ainsi que Gratia y insiste avec raison, que la teneur en bactériophages de suspensions préparées à partir d'une culture donnée peut varier d'une façon considérable suivant le mode de leur préparation et, notamment, suivant le temps écoulé avant l'addition du lysozyme. Nous y reviendrons plus loin. Pour le moment, nous ferons noter que nous n'avons rien à reprendre, ni aux faits rapportés dans notre précédent mémoire, ni à la conclusion que « cette donnée quantitative nous paraît difficilement compatible avec la notion du virus ».

Gratia dit qu'il n'a pu « vérifier aucune des données invoquées par M. et M^{me} Wollman, ni en ce qui concerne la teneur en bactériophage libre des cultures de *B. megatherium* en

bouillon et en gélose, ni en ce qui concerne la libération du bactériophage intracellulaire ». Il nous faut donc examiner ces divers points.

1. — TENEUR EN BACTÉRIOPHAGE LIBRE DES CULTURES DE
B. megatherium EN BOUILLON.

Nous avons été frappés par le titre très bas (10^3 , 10^4) des filtrats des cultures en bouillon de *B. megatherium* lysogène. C'était là une observation tout à fait fortuite et dont la signification nous échappe, mais c'était un fait et nous l'avons signalé comme tel. Nous avons, depuis, noté des titres de 10^5 , et même quelquefois de 10^6 ; très souvent nous retrouvons celui de 10^4 , titre fort bas en comparaison avec celui des lysats bactériophagiques des bactéries sensibles (10^9).

Gratia nous apprend qu'en soumettant les cultures en bouillon à une aération intense (agitation, étalement en couche mince), le développement est très rapide et « d'une densité extraordinaire ». Avec de telles cultures, il a pu noter des titres s'élevant à 10^9 et même 10^{10} . Il est à peine besoin de dire que nos cultures étaient faites dans des conditions plus courantes : les titrages portaient sur des cultures en tubes, à l'étuve à 37° , âgées de trois à quatre jours. Au lieu de conclure, avec Gratia, que le titre bactériophagique des cultures en bouillon est une notion purement contingente, on constate un parallélisme non douteux entre la rapidité et la richesse des cultures et leur titre bactériophagique.

2. — TENEUR EN BACTÉRIOPHAGES DES CULTURES DE
B. megatherium SUR GÉLOSE INCLINÉE ; ÉTAT DES BACTÉRIOPHAGES
DANS CES CULTURES.

Nous avons montré, plus haut, que nous n'avions rien à modifier à notre conclusion quant à la teneur en bactériophages des cultures de *B. megatherium* lysogène sur gélose inclinée. Cette teneur est de même ordre — généralement un peu inférieure — que celle en bactéries ; dans les conditions les plus favorables (cultures jeunes), les deux titres deviennent sensiblement égaux. Par contre, nous avons reconnu que

nous nous étions trompés en admettant que les facteurs lysogènes se trouvaient, dans de telles cultures, à l'état strictement intracellulaire.

Cette conclusion était basée : 1° sur l'absence de bactériophage dans les filtrats de suspensions en eau physiologique et même quelquefois, dans le liquide surnageant après centrifugation de telles suspensions ; 2° sur la très faible proportion de plaques de lyse vraie obtenues en éprouvant ces suspensions en présence de la variété sensible.

EXPÉRIENCES. — I. Une culture de *B. megatherium* 899 sur gélose, âgée de vingt heures (dont treize d'étuve) est émulsionnée dans 10 cent. cubes de bouillon. De cette suspension on porte 1 goutte dans 10 cent. cubes de bouillon (1) et 1 goutte dans 10 cent. cubes d'eau physiologique (2). D'autre part, on prépare une suspension (3) de même densité que ces deux dernières en émulsionnant directement, en eau physiologique, un peu de culture sur gélose. Les trois suspensions sont filtrées sur bougies Chamberland L_3 et titrées quant à leur teneur en facteurs lysogènes en présence de la variété sensible.

Suspension (1) à 10^{-1}	Lyse presque complète.
— à 10^{-2}	200 plaques.
— à 10^{-3}	20 plaques.
Suspension (2) à 10^{-1}	70 plaques.
— à 10^{-2}	0 plaque.
Suspension (3) à 10^{-1}	0 plaque.
— à 10^{-2}	0 plaque.

II. Une culture âgée de cinq heures sur gélose est émulsionnée en bouillon. En partant de cette suspension on prépare des dilutions en portant (1) 1 goutte dans 10 cent. cubes de bouillon ; (2) 1 goutte dans 10 cent. cubes d'eau physiologique. Après filtration sur bougie, ces suspensions donnent :

Suspension (1) à 10^{-2}	Plaques innombrables.
— à 10^{-3}	273 plaques.
Suspension (2) à 10^{-1}	Plaques innombrables.
— à 10^{-2}	250 plaques.

III. On prépare deux suspensions de densité très approximativement égale en émulsionnant un peu de culture de *B. megatherium* sur gélose, âgée de cinq heures, d'une part en bouillon, d'autre part directement en eau physiologique. Filtrées sur bougies, ces deux suspensions donnent, à la dose de 0 c. c. 1, respectivement :

1° Plages innombrables ; 2° 0 plage.

IV. Une culture de *B. megatherium* est émulsionnée dans 36 cent. cubes d'eau physiologique. On filtre sur la même bougie par fractions de 9 cent. cubes. Les filtrats de toutes les fractions sont éprouvés séparément ; tous sont complètement inactifs. On filtre alors sur la même bougie 9 cent. cubes de bouillon stérile ; 0 c. c. 1 de ce filtrat donne 400 plages.

Ces résultats confirment ceux de notre dernier mémoire d'après lesquels les filtrats de suspensions en eau physiologique de *B. megatherium* cultivé sur gélose sèche, sont constamment dépourvus d'activité lytique. Toutefois, les expériences parallèles faites avec des suspensions en bouillon montrent nettement que l'absence d'activité des filtrats dans le premier cas tient non à l'absence de bactériophages extracellulaires, comme nous l'avions admis, mais à la grande intensité avec laquelle le bactériophage du *B. megatherium* est adsorbé par les bougies filtrantes lorsqu'il se trouve en suspension dans l'eau physiologique (22 bis). Ainsi qu'on l'a vu, il suffit d'ajouter de très petites quantités de bouillon (et probablement d'autres produits albuminoïdes) à l'eau physiologique, pour que l'adsorption devienne moins intense. Des expériences parallèles, faites avec un bactériophage staphylococcique et un bactériophage du *B. subtilis* ont montré que le phénomène d'adsorption en eau physiologique est beaucoup moins marqué pour le premier et à peine appréciable pour le deuxième de ces bactériophages.

C'est pour avoir méconnu la rétention par les bougies du bactériophage du *B. megatherium* suspendu en eau physiologique que nous avons conclu, tout naturellement, en quelque sorte, mais à tort, à son état strictement intracellulaire. Cette façon de voir semblait trouver une confirmation dans les résultats de certaines expériences de centrifugation, dans lesquelles

(22 bis) Nous avons constaté, récemment, que cette adsorption du bactériophage du *B. megatherium* n'a pas lieu avec les filtres Schott (modèle 5 sur 3) en verre poreux. Le modèle employé (porosité indiquée : 1 à 5 μ) retenait bien le *B. megatherium* et donnait, à partir de suspensions faites en eau physiologique, des filtrats présentant sensiblement la même teneur en bactériophages que les filtrats des mêmes suspensions en bouillon sur bougie Chamberland L3.

le liquide surnageant était, lui aussi, dépourvu d'activité lytique. Nous verrons plus loin la signification de ces faits.

Quoi qu'il en soit, cette fois-ci Gratia aurait eu raison de relever un désaccord important entre ses nouveaux résultats et les nôtres si nous n'avions pas reconnu notre erreur bien avant la publication de son mémoire. Dans une note datant de mai 1936 (23) nous constatons en effet, que les bactériophages « n'existent pas, dans les cultures sur gélose, à l'état strictement intracellulaire » et qu'« à un certain stade... une partie des corpuscules bactériophages se trouvent à la surface des corps bactériens ». Bien plus, dès ce moment, nous avions reconnu que les « germes lavés » (c'est-à-dire débarrassés des facteurs lysogènes par des centrifugations répétées) « ne contiennent plus de bactériophage » c'est-à-dire n'en libèrent pas sous l'action du lysozyme ; pourtant « toutes les colonies qui en proviennent récupèrent le pouvoir lysogène inhérent à la souche étudiée ». On ne comprend pas bien que Gratia persiste à faire état d'une interprétation à laquelle nous avons nous-mêmes renoncé. En constatant qu'il n'a pas pu « obtenir la libération du bactériophage intracellulaire par la dissolution du *B. megatherium* lysogène », cet auteur ne fait que confirmer les faits que nous venons de rappeler.

Mais si, dans les cultures sur gélose de *B. megatherium*, les facteurs lysogènes ne sont pas intracellulaires, dans quel état s'y trouvent-ils et comment agit le lysozyme ?

En ce qui concerne le premier point, Gartia dit dans son nouveau travail, que ces cultures sur gélose, il les a « toujours trouvées pourvues de bactériophage libre ». Il suffit de rapprocher cette phrase de celle qu'on trouve, à ce sujet, dans son travail précédent (24) pour voir que cela ne va pas de soi. Gratia y dit, en effet : « Il n'est pas exact, notamment, que la culture de *B. megatherium* lysogène sur gélose même ultra-sèche soit toujours exempte de bactériophage. »

(23) *G. R. Soc. Biol.*, **422**, 1936, p. 190.

(24) Ces *Annales*, **56**, 1936, p. 306. Le titre même de ce travail : « La libération du bactériophage contenu dans les bactéries dites lysogènes », ainsi que la conclusion (*ibid.* p. 308) : « Ainsi donc, trois méthodes différentes ont permis d'extraire le bactériophage contenu dans les cultures lysogènes », montrent clairement que Gratia, lui aussi, avait admis, pour commencer, la libération des bactériophages intracellulaires.

C'est qu'en effet les choses ne sont pas simples et que les phénomènes d'attachement sur lesquels Gratia a raison d'insister jouent un rôle important. Seulement, pour nous, cet attachement est le fait initial, mais fragile, divers moyens (centrifugation, filtration en milieu convenable et surtout, nous allons le voir, dissolution par le lysozyme) permettant d'opérer la dissociation du complexe : bactéries lysogènes — corpus-

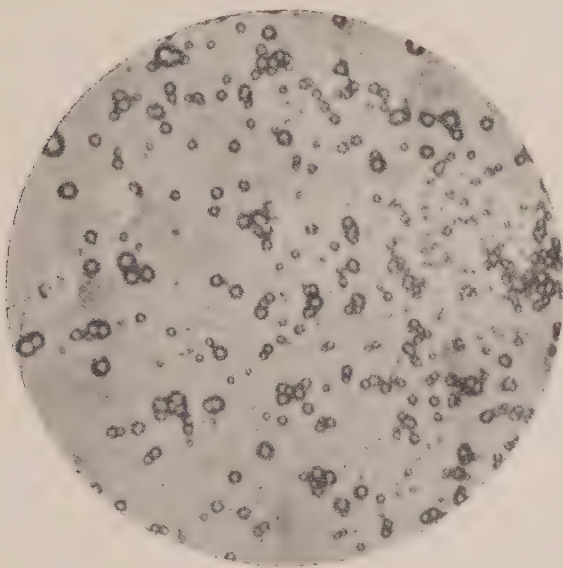


FIG. 1. — Mutilat sensible + suspension de *B. megatherium* lysogène ;
absence pratiquement totale de plages de lyse vraies.

cules bactériophages. Pour Gratia, l'attachement est un phénomène secondaire, les bactériophages se trouvant primitivement libres dans les suspensions bactériennes. Une fois admis que les facteurs lysogènes, tels que nous les connaissons, ne sont pas intracellulaires, il pourrait sembler oiseux de chercher à discriminer entre ces deux manières de voir. Aussi nous contenterons-nous de dire brièvement sur quoi s'appuie la nôtre.

Dans une suspension épaisse de mutilat sensible, introduisons une trace de suspension légère de *B. megatherium* lysogène et étalons le tout à la surface de la gélose d'une boîte de Petri. Parmi les nombreuses

plages qui trouent le tapis formé par la culture de mutilat sensible, une très faible proportion (5 à 10 p. 100) sont des plages de lyse vraie ; les autres portent au centre une colonie de *B. megatherium*. A diverses reprises même, nous avons obtenu ainsi des préparations où les plages de lyse vraie faisaient pratiquement défaut (fig. 1).

On doit en conclure que les suspensions de *B. megatherium* sont très pauvres en bactériophages libres. Or, il suffit de traiter ces suspensions par le lysozyme pour voir apparaître des plages de lyse vraie plus ou moins abondantes, suivant les proportions établies dans notre mémoire précédent et rappelées plus haut. Nous nous étions demandé, dès le début, si l'absence de plages vraies ne s'expliquait pas par l'adsorption secondaire de facteurs lysogènes primitivement libres. Nous avons donc répété l'expérience ci-dessus en mélangeant la suspension de *B. megatherium* à du filtrat de culture de ce germe (bactériophages libres). Les plages de lyse vraie apparaissent, dans ce cas, dans les proportions prévisibles [fig. 2] (25).

Sans vouloir nier l'adsorption des bactériophages libres par le *B. megatherium* lysogène (le fait est classique avec les bactéries sensibles), une telle adsorption ne semble pas intervenir dans les conditions de nos expériences.

Que l'on accepte la façon de voir de Gratia ou la nôtre, un fait est certain, c'est que les corpuscules bactériophages ne sont pas contenus comme tels dans les cellules bactériennes. Comment, dans ces conditions, le lysozyme agit-il ?

Pour Gratia, « l'action du lysozyme aboutit exactement au même résultat que la centrifugation ; elle élimine les bactéries lysogènes et conserve les particules de bactériophage libre ». Nous souscrivons volontiers à cette opinion, au mot *exactement* près. Il est parfaitement vrai, comme le dit encore Gratia, que les émulsions dissoutes par le lysozyme ne contiennent pas d'autre bactériophage que celui qui s'y trouvait avant la dissolution. Nous ajouterons seulement qu'elles le contiennent en totalité, alors que les autres moyens qu'on

(25) Cette figure, ainsi que la précédente, ont été projetées au II^e Congrès international de Londres (1936). Nous devons toutes les photographies qui figurent dans ce travail, ainsi que celles qui ont servi à déterminer les dimensions du *B. megatherium*, à M. P. Jeantet, chef du Service photographique de l'Institut Pasteur, que nous remercions ici.

peut employer pour éliminer les corps bactériens (centrifugation, filtration, eau physiologique) entraînent une perte plus ou moins considérable en facteurs lysogènes. De là, et sans qu'il y ait « libération » à proprement parler, la teneur plus élevée, en bactériophages, des suspensions lysozymées.

En effet, que le phénomène d'attachement soit primitif ou secondaire, il entraîne l'inactivation des facteurs lysogènes.

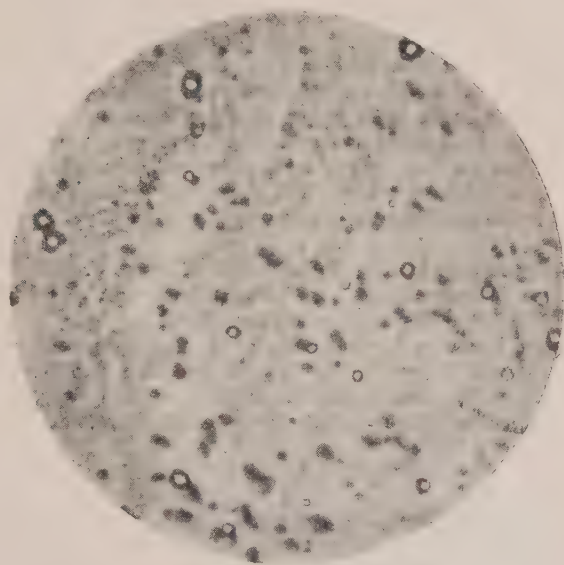


FIG. 2. — Mutilat sensible + mélange à parties égales d'une suspension légère de *B. megatherium* lysogène et d'une dilution à 10^{-2} de bactériophage (filtrat) de *B. megatherium*. Abondance de plages vraies.

C'est parce que cette inactivation y est réduite au *minimum* ou même nulle que les suspensions lysozymées ont un titre bactériophagique élevé.

Gratia lui-même montre (26) qu'il suffit d'un contact de trente minutes entre bacilles et corpuscules bactériophages pour que le titre du liquide surnageant après centrifugation baisse de mille fois par comparaison avec le titre initial, malgré la présence de bactériophage libre surajouté. Ainsi que nous

(26) Ces Annales, **57**, 1936, p. 666.

l'avons déjà dit, nous avons, à diverses reprises, obtenu des liquides surnageants totalement inactifs. On comprend, dans ces conditions, que l'action du lysozyme qui conserve les bactériophages de façon pratiquement parfaite, ne puisse fournir « exactement » les mêmes résultats que la centrifugation.

EXPÉRIENCES. — I. Une suspension de *B. megatherium* (culture sur gélose inclinée de seize heures, dont treize à l'étuve) donne, à l'ensemencement immédiat, en présence du mutilat sensible, 700 plages à colonie centrale et 100 plages vraies (27) pour 0 c. c. 05 de suspension. On centrifuge aussitôt ; 0 c. c. 5 de liquide surnageant donne 100 plages. Ce résultat est donc tout à fait superposable à ceux de Gratia. Dans cette expérience, l'action du lysozyme n'a pas encore été comparée ; la partie non centrifugée de la suspension gardée en eau physiologique a donné 200 plages au bout d'une heure et 70 plages après cinq heures.

II. Une culture entière de *B. megatherium* (dix-huit heures dont treize à 37°) est mise en suspension dans XX gouttes de bouillon. A partir de cette suspension très épaisse, on prépare les suspensions suivantes :

a) V gouttes de suspension dans 5 cent. cubes de bouillon.

b) V gouttes de suspension dans 5 cent. cubes de bactériophage de *B. megatherium* (filtrat de culture en bouillon).

D'autre part, I goutte de suspension est diluée dans 10 cent. cubes d'eau physiologique et traitée par le lysozyme. Les tubes *a* et *b*, après trente minutes de contact, sont centrifugés pendant dix minutes. Les liquides surnageants donnent, en présence du mutilat sensible, les résultats suivants :

a) $10^{-4} : \pm 1.000$ plages ; 10^{-5} : 82 et 104 plages (moyenne 93) ; 10^{-6} : 9 plages.

b) 10^{-4} : lyse marquée > 2.000 plages ; 10^{-5} : 220 plages ; 10^{-6} : 10 plages.

Traitée par le lysozyme en eau physiologique, la même quantité de suspension a donné à 10^{-4} : lyse complète ; 10^{-5} : lyse presque complète ; $10^{-6} : \pm 2.000$ plages ; 10^{-7} : 100 plages ; 10^{-8} : 14 plages.

III. Une culture entière de *B. megatherium* (dix-huit heures dont treize heures à 37°), est mise en suspension dans XL gouttes de bouillon. On fait les suspensions suivantes :

a) V gouttes de suspension dans 5 cent. cubes de bouillon.

b) V gouttes de suspension dans 5 cent. cubes d'eau physiologique.

c) V gouttes de suspension dans 5 cent. cubes de bactériophage (filtrat de culture de *B. megatherium* en bouillon).

D'autre part, on prépare les deux suspensions suivantes :

d) I goutte de la suspension initiale dans 10 cent. cubes de bouillon + lysozyme ;

(27) Il y a lieu de faire remarquer que des plages à colonies centrales restées au-dessous des limites de la visibilité peuvent en imposer pour des plages vraies.

e) 1 goutte de la suspension initiale dans 10 cent. cubes d'eau physiologique + lysozyme.

Les tubes *a*, *b* et *c* sont centrifugés après séjour de trente minutes au laboratoire et le liquide surnageant soumis au titrage, de même que le contenu des tubes *d* et *e*. Voici les résultats exprimés en dilutions de la suspension initiale.

- a*) 10^{-4} : 700 plages ; 10^{-5} : 65 plages ; 10^{-6} : 4 plages ;
- b*) 10^{-4} : 820 plages ; 10^{-5} : 65 plages ; 10^{-6} : 7 plages ;
- c*) 10^{-4} : 400 plages ; 10^{-5} : 80 plages ; 10^{-6} : 6 plages ;
- d*) 10^{-4} : lyse très prononcée ; 10^{-5} : ± 1.000 plages ; 10^{-6} : 70-80 plages ; 10^{-7} : 5 plages ;
- e*) 10^{-4} : lyse prononcée ; 10^{-5} : 200 plages ; 10^{-6} : 10 plages ; 10^{-7} : 1 plage.

La présence de bactériophage libre n'a pas exercé d'effet marqué sur les résultats, ce qui était à prévoir, le titre du bactériophage employé étant 10^6 (10^{-6} 4 plages). Aussi, est-il difficile de se prononcer sur le fait de savoir s'il y a eu inactivation (Cf. tube *b* de l'expérience II et tube *c* de l'expérience III).

Par contre, le « rendement » en bactériophages est beaucoup plus fort pour les suspensions traitées par le lysozyme que pour les suspensions centrifugées.

IV. On émulsionne, en bouillon, un peu de culture de *B. megatherium* sur gélose sèche (seize heures dont treize d'étuve).

0 c. c. 05 de cette suspension donne à l'étalement immédiat avec la variété sensible, 102 plages à colonie centrale ; 10 plages vraies. On centrifuge aussitôt ; 0 c. c. 05 de bouillon surnageant donne 0 plage.

L'ensemencement en mélange avec la variété sensible est répétée cinq heures plus tard. On obtient 2 plages à colonie centrale et 22 plages vraies. Après centrifugation 0 c. c. 1 de bouillon surnageant donne 0 plage.

Outre la centrifugation, on peut employer, pour éliminer les corps bactériens, la filtration ou, encore, l'action de l'eau physiologique. La première technique, nous l'avons vu, donne, avec les suspensions en eau physiologique, des filtrats totalement inactifs. Même avec des suspensions en bouillon, les résultats peuvent varier, pour la même suspension, d'une bougie à l'autre.

L'eau physiologique, ainsi que Gratia l'avait fait remarquer (28), exerce une action bactéricide considérable sur le

(28) Ces Annales, 56, 1936, p. 315.

B. megatherium (29). Cette action est particulièrement intense pour les cultures jeunes qui peuvent être stérilisées en quelques minutes. D'autre part, par elle-même et contrairement au bouillon, l'eau physiologique est sans action sur les corpuscules bactériophages. On conçoit, dans ces conditions, qu'avec de très jeunes cultures, l'eau physiologique peut fournir un « rendement » en facteurs lysogènes approchant, pour des suspensions fraîchement préparées, celui qu'on obtient avec le lysozyme. Avec des cultures plus âgées (dix-huit à vingt heures), le nombre de facteurs lysogènes décelés par l'action de l'eau physiologique reste sensiblement inférieur à celui que fournissent les suspensions lysozymées, en raison de l'inactivation des bactériophages en présence des corps bactériens. Les expériences suivantes illustrent ces différents points.

EXPÉRIENCES I. — I goutte de bactériophage de *B. megatherium* (filtrat de culture en bouillon) est diluée dans 9 cent. cubes d'eau physiologique. I goutte de cette dilution éprouvée aussitôt donne environ 1.500 plages ; on obtient sensiblement le même chiffre après soixante-quinze minutes, cinq heures et demie, huit heures et demie.

II. I goutte de bactériophage de *B. megatherium* est diluée dans 10 cent. cubes d'eau physiologique ; II gouttes de cette dilution donnent environ 3.000 plages ; le même chiffre, approximativement, est retrouvé lors des épreuves faites quatre heures, vingt heures et dix-sept jours plus tard.

Nous arrêterons là ces exemples qui montrent que le titre bactériophagique d'une dilution faite en eau physiologique reste sensiblement constant : l'eau physiologique n'exerce aucun effet nocif sur les facteurs lysogènes.

Les choses se passent autrement si, au lieu d'une suspension de corpuscules bactériophages libres, nous considérons une suspension en eau physiologique de *B. megatherium* lysogène.

EXPÉRIENCES. — I. On prépare une suspension légère en eau physiologique de culture sur gélose inclinée de *B. megatherium* âgée de seize heures (neuf heures d'étuve). Mélangée à 0 c. c. 2 de suspension épaisse de mutilat, 0 c. c. 1 de cette suspension donne, à l'ensemencement immédiat, 1.600 plages à colonie centrale de *B. megatherium* et 140 plages de lyse vraie. Après vingt minutes de séjour en eau physio-

(29) Nous avons pu nous assurer que cette action bactéricide n'est pas due à l'influence non compensée du ion Na^+ . En effet, l'addition de ions Ca^{++} la laisse intacte.

logique on obtient, dans les mêmes conditions, 260 plages à colonie centrale et 460 plages vraies ; après cinquante minutes, 2 plages à colonie centrale et 120 plages vraies.

II. On fait une suspension en eau physiologique d'une culture de *B. megatherium* âgée de vingt et une heure (treize heures d'étuve) ; 0 c. c. 1 de cette suspension mélangée à 0 c. c. 2 de suspension épaisse de mutilat donne, à l'ensemencement immédiat, une lyse à peu près complète de ce dernier germe avec d'innombrables colonies de *B. megatherium*. Après une heure quarante-cinq minutes on obtient, dans les mêmes conditions, 1.650 plages vraies ; quatre jours plus tard, la même suspension ne fournit plus que 20 plages vraies. Or, dissoute par le lysozyme, cette suspension a donné à la dose de 0 c. c. 1, une heure après sa préparation aussi bien que quatre jours plus tard, une lyse à peu près complète.

Ces expériences montrent l'inactivation assez rapide et progressive des bactériophages dans une suspension de *B. megatherium* en eau physiologique. Elles font comprendre que pas plus que la centrifugation, l'action de l'eau physiologique ne puisse fournir les quantités de bactériophages qu'on obtient au moyen du lysozyme. Les expériences suivantes le montrent nettement.

EXPÉRIENCES. — I. On fait une légère suspension en eau physiologique avec du *B. megatherium* sur gélose, âgé de vingt et une heures (treize heures d'étuve). L'ensemencement immédiat de cette suspension, telle quelle, et à la dilution de 1 p. 200 donne, respectivement, environ 3.000 et 16 colonies.

Une partie de cette suspension est conservée telle quelle, une autre additionnée de lysozyme (II gouttes de blanc d'œuf à 1 p. 5). Après vingt minutes de contact, la première partie fournit 260 plages vraies, la partie lysozymée 2.500 plages.

II. Une suspension en eau physiologique de *B. megatherium* (culture de vingt-trois heures, dont quatorze heures d'étuve), fournit à l'ensemencement immédiat environ 2.000 colonies par 0 c. c. 1. Après soixante-quinze minutes à la dilution de 1 p. 20, l'ensemencement reste stérile, tandis que 0 c. c. 1 donne, en présence de la variété sensible, 47 plages. La suspension lysozymée fournit, dans les mêmes conditions, 100 plages.

On voit, par ces exemples, une fois de plus, qu'on décèle, dans une suspension de *B. megatherium*, au moyen du lysozyme, approximativement autant de corpuscules bactériophages, qu'on obtient de colonies à l'ensemencement ; les chiffres obtenus au moyen de l'eau physiologique sont moins élevés.

Ainsi que nous l'avons dit plus haut, du fait de son action bactéricide pour le *B. megatherium* (surtout pour les très jeunes cultures) et de l'absence de tout effet nocif sur le bactériophage de ce germe, l'eau physiologique peut, dans le tout premier temps, donner des résultats approchant, pour le



FIG. 3 a. — Mutilat + suspension de *B. megatherium* lysogène tué par un séjour de quinze heures dans l'eau physiologique, centrifugé et lavé à 4 reprises dans l'eau physiologique : 3 ou 4 plages de lyse.

« rendement » en bactériophage, de ceux qu'on obtient avec le lysozyme. Assez tôt pourtant, intervient le phénomène d'inactivation par les corps bactériens morts qui fait rapidement baisser le titre bactériophagique des suspensions.

Pendant quelque temps ce phénomène d'inactivation paraît être réversible : tout au moins parvient-on, au moyen du lysozyme, à augmenter d'une façon plus ou moins prononcée

la teneur en bactériophage actif de suspensions de *B. megatherium* tué par l'eau physiologique.

EXPÉRIENCES. — I. On prépare une suspension légèrement trouble de *B. megatherium* (vingt heures à la température du laboratoire) en eau physiologique. On porte à l'étuve pendant quatre heures. L'ensemencement fait à ce moment reste stérile. Après quinze heures de

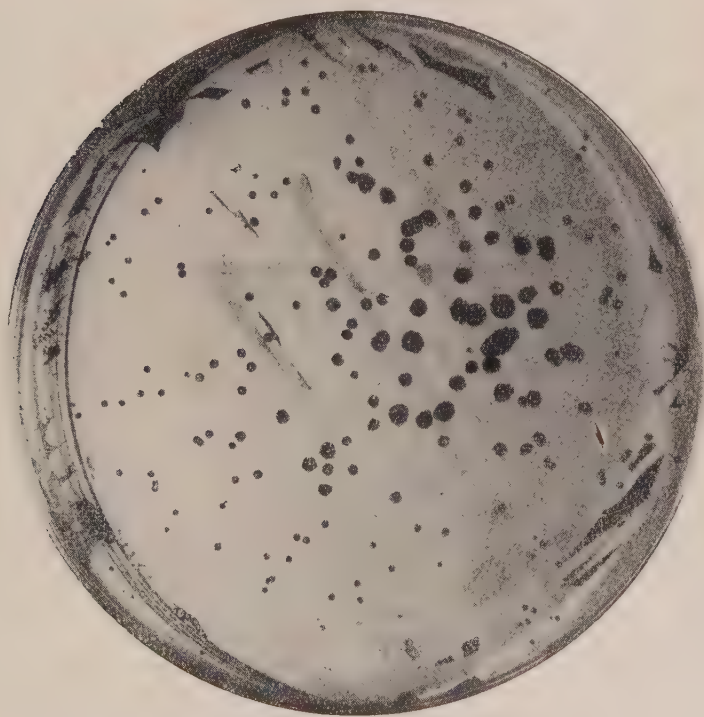


FIG. 3 *b*. — Même préparation + lysozyme : plus de 200 plages.

séjour à l'étuve, on centrifuge à quatre reprises dans de l'eau physiologique qu'on renouvelle chaque fois. Le quatrième liquide de lavage donne une plage à la dose de 0 c. c. 1.

Suspendu dans 9 cent. cubes d'eau physiologique, le quatrième culot de centrifugation fournit, à la dose de 0 c. c. 1, 2 plages en présence de la variété sensible. Après traitement par le lysozyme, la même quantité fournit plus de 200 plages (fig. 3).

Dans d'autres expériences du même ordre, nous avons

obtenu, avec le quatrième culot (0 c. c. 4), avant et après traitement par le lysozyme, respectivement, les résultats suivants :

	1	2	3	4
Avant traitement.	125	280	300	± 400
Après traitement.	600	± 10.000 (450 à 1/20)	> 2.000	> 5.000

Le lysozyme, on le voit, permet, dans une certaine mesure, de récupérer les bactériophages devenus inactifs. On comprend que des faits de cet ordre aient pu, au début, faire croire à la libération de facteurs lysogènes intracellulaires (30).

Les choses se passent différemment lorsqu'au lieu d'eau physiologique, les émulsions de *B. megatherium* sont faites en bouillon. Celui-ci exerce une action nocive marquée non seulement sur les bacilles (tout au moins au début), mais aussi sur les facteurs lysogènes lorsque ceux-ci se trouvent en dilution étendue. Cette fragilité au bouillon semble être particulière au bactériophage du *B. megatherium*, car nous ne l'avons retrouvée ni avec celui du *B. subtilis*, ni même avec celui relativement fragile, du staphylocoque.

EXPÉRIENCES. — I. On dilue 1 goutte de bactériophage de *B. megatherium* (titre 10^5 , filtrat d'une culture en bouillon) dans 9 cent. cubes de bouillon ; 0 c. c. 1 de cette dilution donne, à l'épreuve immédiate : 500 plages ; quatre heures et demie plus tard : 42 plages ; vingt heures plus tard : 7 plages ; dix-sept jours plus tard : 0 plage.

II. On dilue 1 goutte de bactériophage de *B. megatherium* dans 9 cent. cubes de bouillon ; 0 c. c. 1 de cette dilution donne, à l'épreuve immédiate, 440 plages ; après une heure quinze minutes, 61 plages ; après huit heures trente minutes, 15 plages.

Lorsqu'on fait des suspensions étendues de *B. megatherium* en bouillon, il faut donc tenir compte de l'effet nocif exercé par ce milieu sur les corpuscules bactériophages. L'épreuve immédiate donne, pour les suspensions en bouillon comme pour celles faites en eau physiologique, une grande majorité de plages à colonies centrales de *B. megatherium*, mais, contrairement à ce que nous avons vu avec les suspensions en eau

(30) C'est peut-être par un mécanisme analogue que s'expliquent, en partie tout au moins, les résultats que nous avons observés avec les culots de centrifugation de cultures en bouillon (Ces *Annales*, 56, 1936, p. 137. Voir aussi A. Gratia, ces *Annales*, 57, 1936, p. 671).

physiologique, on ne constate pas, par la suite, d'augmentation du nombre des plages vraies. Celui des plages à colonies centrales baisse dans les heures qui suivent, pour tomber à 0 (c'est-à-dire que tous les germes meurent) lorsque la suspension est très étendue, ou pour se relever à nouveau lorsque la culture se développe ; on peut observer, dans ce dernier cas, une augmentation du nombre de plages vraies ; preuve de plus, en passant, que pour les bactéries lysogènes, comme pour les germes sensibles, la reproduction des bactériophages est liée strictement à celle des bactéries. Tout se passe, avec les suspensions en bouillon — et ces faits sont en parfait accord avec les constatations de Gratia —, comme si le lysozyme ne décelait que les corpuscules bactériophages détachés — ou sur le point de l'être — des corps bactériens (31).

EXPÉRIENCES. — I. On émulsionne en bouillon un peu de culture sur gélose sèche de *B. megatherium*. Les étalements successifs, en mélange avec la variété sensible, donnent les résultats suivants, à la dose de 0 c. c. 1 :

1° Immédiatement : lyse très prononcée, avec de très nombreuses colonies de *B. megatherium* ; à la dilution de 1 p. 10, 226 plages à colonie centrale ; 26 plages vraies.

2° Après deux heures : 2 plages à colonie ; 20 plages vraies.

3° Après cinq heures : 2 plages à colonie ; 30 plages vraies.

4° Après huit heures : 2 plages à colonie ; 35 plages vraies.

5° Après trente-deux heures : 7 plages vraies.

6° Après quarante-huit heures : 0 plage.

7° Après cinquante-cinq heures : 2 plages.

8° Après soixante-douze heures : 1 plage.

II. On émulsionne en bouillon un peu de culture de *B. megatherium* sur gélose fraîche. Les étalements successifs, en mélange avec la variété sensible donnent, pour 0 c. c. 1 d'émulsion, les résultats suivants :

1° Immédiatement : lyse très prononcée avec plusieurs milliers de colonies de *B. megatherium* ; à la dilution de 1 p. 10, environ 500 plages à colonie centrale ; 35 plages vraies.

2° Après deux heures : ± 650 plages à colonie ; 120 plages vraies.

3° Après cinq heures trente minutes : 75 plages à colonie ; 40 plages vraies.

4° Après huit heures : 55 plages à colonie ; 15 plages vraies.

5° Après vingt-quatre heures : 73 plages à colonie ; 7 plages vraies.

6° Après trente et une heures : 60 plages à colonie ; 2 plages vraies.

7° Après quarante-huit heures : 75 plages à colonie ; 30 plages vraies.

8° Après cinquante-cinq heures : 100 plages à colonie ; 35 plages vraies.

(31) Nous rappellerons ici que, le plus souvent, le lysozyme ne détermine pas d'augmentation marquée du titre bactériophagique des cultures de *B. megatherium* en bouillon.

9° Après soixante-douze heures : lyse très marquée ; l'énorme majorité des plages est à colonie centrale.

10° Après quatre-vingt-seize heures : 0 c. c. 1 de dilution à 1 p. 10 donne ± 1.000 plages à colonie ; environ 30 plages vraies.

L'ensemble des faits que nous venons de passer en revue montre que divers facteurs influent sur la teneur en bactériophages des suspensions de *B. megatherium* lysogène. En premier lieu, l'inactivation des facteurs lysogènes par les corps bactériens (32), phénomène sur lequel Gratia insiste à juste titre et, en fonction de cette inactivation, l'âge des suspensions ; enfin, le milieu dans lequel se trouve la suspension bactérienne. Tous ces facteurs interviennent pour faire baisser le titre bactériophagique.

Or, la détermination du rapport quantitatif — bactéries lysogènes : bactériophages — suppose une technique qui permette d'éliminer les corps bactériens sans perte appréciable en bactériophages. Parmi les moyens dont on dispose pour ce faire, l'action du lysozyme en eau physiologique fournit les meilleurs résultats. En effet, en dissolvant les corps bactériens, le lysozyme supprime complètement leur effet inactivant ; d'autre part, nous l'avons vu, ni le lysozyme, ni l'eau physiologique n'exercent d'action nocive sur les facteurs lysogènes.

Aussi, le « rendement » en bactériophages obtenu en dissolvant au moyen du lysozyme des suspensions de *B. megatherium* en eau physiologique est notablement supérieur à celui fourni par les autres moyens et, notamment, au chiffre qu'on obtient en mélangeant directement ces suspensions au mutilat sensible (*contra* Gratia).

Mais même avec le lysozyme, le titre bactériophagique reste inférieur au titre bactérien et n'atteint celui-ci que dans les conditions les plus favorables, avec des cultures jeunes de *B. megatherium*. L'argument que nous avons cru pouvoir en tirer contre la théorie parasitaire dans laquelle le rapport bactériophages : bactéries aurait dû s'exprimer par un chiffre très élevé, subsiste donc en entier.

(32) Cette inactivation n'a lieu qu'en présence de germes homologues au bactériophage considéré. Il n'y a pas d'inactivation de bactériophage du *B. megatherium*, en présence du *B. subtilis*, par exemple.

II. — Les phases de la fonction lysogène (33).

La considération des faits qui précèdent ainsi que de ceux que nous allons maintenant exposer, conduit à une notion nouvelle, fort importante : les bactériophages ou facteurs lysogènes, tels que nous les connaissons, ne représentent qu'une *phase*, un état particulier dans l'évolution de ces éléments. Le point de départ de cette notion a été fourni par les expériences suivantes (34) :

Lorsqu'on soumet à des centrifugations répétées des suspensions plus ou moins épaisses (35) de *B. megatherium* en remplaçant chaque fois le liquide surnageant par du liquide neuf, on constate que les liquides des lavages successifs contiennent des bactériophages en quantités de plus en plus faibles. Si l'on remet en suspension le culot bactérien de la dernière centrifugation et qu'on le dissolve au moyen de lysozyme, on constate que le titre bactériophagique du lysat ainsi obtenu est très bas, en comparaison avec celui fourni par la suspension de départ. Alors qu'on obtient avec celle-ci, comme on sait, approximativement autant de bactériophages qu'elle fournit de colonies à l'ensemencement, les suspensions « lavées » à cinq ou six reprises n'en fournissent que dans la proportion d'un facteur lysogène pour des milliers de bactéries. Or, si nous éprouvons en présence de la variété sensible ces germes « lavés » et qui ne fournissent plus de bactériophages sous l'action du lysozyme, nous constatons que toutes

(33) *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 1937, p. 931.

(34) *Ibid.*, **122**, 1936, p. 190.

(35) Très fragile en eau physiologique lorsqu'il se trouve en suspension étendue, le *B. megatherium* s'y conserve bien en suspension épaisse. Ces suspensions épaisses en eau physiologique offrent même un moyen simple et commode pour la conservation de germes réputés comme très fragiles. Nous avons pu conserver ainsi pendant plus de quatre mois (temps limite d'observation), du mutilat en eau physiologique, alors que les cultures meurent en une dizaine de jours sur gélose inclinée à la chambre. De même, le gonocoque a pu être conservé en vie pendant quinze jours (à l'étuve), le bacille de Shiga plus de soixante jours. Dans tous ces cas, il semble y avoir multiplication des germes aux dépens des produits d'autolyse.

les colonies sont entourées, de nouveau, de la zone de lyse caractéristique : tous les germes « lavés », sans exception, ont régénéré des bactériophages au cours de leur multiplication.

EXPÉRIENCE. — Une culture de *B. megatherium* sur gélose est émulsionnée dans 20 cent. cubes de bouillon. La numération fournit environ 2.000.000 de colonies par centimètre cube de suspension (> 1.600 colonies à la dilution de 10^{-3} .) Une petite quantité de cette suspension traitée par le lysozyme fournit environ 4.000.000 de bactériophages par centimètre cube (400 plages pour 0 c. c. 1 à la dilution de 10^{-3}). Le reste est soumis à des centrifugations répétées (vingt minutes à 5-6.000 tours à la minute) en décantant chaque fois le bouillon surnageant et en le remplaçant par du bouillon neuf. Le cinquième culot de centrifugation est remis en suspension dans 20 cent. cubes de bouillon neuf. L'ensemencement de cette suspension « lavée » fournit environ 700.000 colonies par centimètre cube, alors que traitée par le lysozyme elle ne donne que 350 plages pour la même quantité. La proportion de bactériophages est donc environ quatre mille fois plus faible que pour la suspension de départ et n'est plus que d'un corpuscule bactériophage pour 2.000 colonies ; en admettant que celles-ci correspondent à des chaînettes de 10 bacilles, il n'y aurait plus qu'un seul facteur lysogène pour 20.000 bactéries.

Dans d'autres expériences on a obtenu, pour le dernier culot de centrifugation, une plage, respectivement, pour 350, 1.000 et 10.000 colonies.

Le tableau suivant donne une idée de la teneur en bactériophages par centimètre cube de liquides de lavages successifs :

	BOUILLON (une culture dans 20 cent. cubes)	EAU PHYSIOLOGIQUE (deux cultures dans 20 cent. cubes)
Premier lavage . .	± 900.000 (0 c. c. 03 à 1 p. 200 : 230 plages).	1.600 000
Deuxième lavage . .	0 c. c. 03 non dilué : lyse presque complète.	12.000
Troisième lavage . .	0 c. c. 1 non dilué : lyse presque complète.	6.000
Quatrième lavage . .	0 c. c. 1 non dilué : 2.000.	2.500
Cinquième lavage . .	0 c. c. 1 non dilué : 800.	1.500

Or, ainsi que nous le disons plus haut, toutes les colonies qui se développent à partir des germes « lavés » de ces suspensions si pauvres en bactériophages sont lysogènes au même titre que celles qui proviennent des suspensions normales de départ.

EXPÉRIENCES. — I. Le culot bactérien de la cinquième centrifugation donne, à l'ensemencement, $\pm 3.000.000$ de colonies par centimètre cube.

Ensemencé en présence de la variété sensible, ce même culot fournit 1.500.000 plages à colonie centrale de *B. megatherium*.

II. Le cinquième culot de centrifugation donne, à l'ensemencement direct, environ 700.000 colonies au centimètre cube ; ce même culot, mélangé au mutilat sensible, fournit environ 400.000 plages à colonie centrale de *B. megatherium* (36).

D'autre part, ces germes « lavés » dans lesquels le lysozyme ne décèle pas de corpuscules bactériophages, gardent intacte la fonction antigène caractéristique de ceux-ci.

EXPÉRIENCE. — Des cultures jeunes de *B. megatherium* sur gélose inclinée sont émulsionnées en eau physiologique à raison d'une culture par 10 cent. cubes. Cette suspension est centrifugée à six reprises en remplaçant chaque fois le liquide surnageant par de l'eau physiologique neuve. Le sixième culot de centrifugation est suspendu dans 10 cent. cubes et injecté dans la veine de deux lapins à raison de 5 cent. cubes par lapin et par injection. Après trois injections faites à huit jours d'intervalle, on prélève du sang à l'un de ces lapins (n° 68). Ce sérum est éprouvé, au point de vue de son pouvoir neutralisant pour le bactériophage du *B. megatherium*, en même temps qu'un autre sérum (n° 61) provenant d'un lapin traité, dans les mêmes conditions, par des suspensions de *B. megatherium* jeune chauffées à 75° pendant une heure. Les mélanges sérum + bactériophage sont laissés quinze heures à l'étuve et éprouvés en présence du mutilat sensible. Voici les résultats obtenus :

Sérum 68 (anti-*B. megatherium* jeune lavé) :

1 partie de sérum 20 parties de bactériophage	} 2 plages.	1 partie de sérum 10 parties de bactériophage	} 1 plage.
1 partie de sérum 5 parties de bactériophage	} 0 plage.	1 partie de sérum 1 partie de bactériophage	} 0 plage.

Sérum 61 (anti-*B. megatherium* jeune chauffé à 75°) :

1 partie de sérum 20 parties de bactériophage	} lyse complète.	1 partie de sérum 10 parties de bactériophage	} lyse complète.
1 partie de sérum 5 parties de bactériophage	} lyse complète.	1 partie de sérum 1 partie de bactériophage	} lyse complète.

(36) Dans quelques expériences, ces colonies centrales de *B. megatherium*, ainsi que les plages qui les entourent sont assez petites (< 1 millimètre de diamètre). Ce fait doit s'expliquer par la multiplication relativement lente des germes ayant fait l'objet des manipulations (centrifugation, lavage) par rapport à celle du mutilat sensible.

Témoin :

(Bactériophage seul). X gouttes : lyse complète; V gouttes : lyse complète; I goutte : lyse complète.

On voit que le sérum 68 préparé avec des cultures « lavées » et pratiquement dépourvues de facteurs lysogènes actifs neutralise le bactériophage du *B. megatherium* normal ; ce pouvoir neutralisant est même beaucoup plus élevé que celui de sérums préparés avec le bactériophage lui-même [filtrat de cultures en bouillon de *B. megatherium*] (37). Par contre, le sérum 61 préparé avec des cultures jeunes de *B. megatherium* chauffées à 75° est dépourvu de toute action neutralisante dans les proportions employées [contrairement aux sérums préparés avec des *spores* lysogènes chauffées] (38).

Ces expériences établissent un fait important : les suspensions de *B. megatherium* « lavé » pratiquement dépourvues de bactériophages actifs, décelables par le lysozyme, ne sont pas constituées par des germes « ultra-purs » (d'Hérelle). Ces germes « lavés » conservent intégralement la propriété de reproduire des facteurs lysogènes lors de leur multiplication, ainsi que la fonction antigénique caractéristique de ces éléments. Cette fonction, rappelons-le, fait défaut à la variété sensible de *B. megatherium* (mutilat) (39).

L'impossibilité qu'il y a à purifier le *B. megatherium* — c'est-à-dire à obtenir des germes privés dorénavant de fonction lysogène — en le débarrassant des bactériophages actifs contenus dans les cultures, est confirmée par les résultats d'expériences sur l'action du sérum anti-bactériophage.

Ainsi que Bordet et Ciuca l'ont montré les premiers (40), on réussit facilement à purifier, à « guérir », au moyen d'un tel sérum, des cultures de bactéries sensibles « contaminées » par le bactériophage correspondant. Le fait se conçoit du reste, aisément, chez ces bactéries, chez lesquelles l'action du bactériophage aboutit à la lyse des corps microbiens : seuls, dans les lysats, les corpuscules bactériophages repré-

(37) Ces *Annales*, **56**, 1936, p. 144 et 145 (sérums 18 et 25).

(38) Ces *Annales*, **56**, p. 145 (sérums 15 et 16).

(39) *Ibid.*, p. 145 (sérum 33).

(40) *C. R. Soc. Biol.*, **84**, 1921, p. 748.

sentent le support de la fonction lysogène et ces corpuscules se trouvent exposés au contact direct du sérum anti-bactériophage. Rien ne permettait d'affirmer, *a priori*, qu'il dût en être de même dans le cas des germes résistants lysogènes chez lesquels les facteurs lysogènes seraient contenus dans les cellules bactériennes et, par conséquent, soustraits à l'action du sérum neutralisant. Or, précisément, les expériences que nous venons de rapporter montrent qu'il n'en est rien et que le lysozyme ne décèle pas de facteurs lysogènes au sein des cellules bactériennes. Les bactériophages, comme tels, n'existent, dans les cultures lysogènes, qu'à l'extérieur des bactéries et peuvent, par conséquent, dans ce cas, comme dans celui des bactéries sensibles, être neutralisés par le sérum anti-bactériophage. Si les corpuscules bactériophages étaient le seul support de la fonction lysogène, on devrait, par conséquent, pouvoir « guérir » au moyen d'un tel sérum les germes lysogènes aussi bien que les bactéries sensibles.

Des expériences préliminaires nous ont tout d'abord permis de retrouver pleinement les résultats de Bordet et Ciuca : la *purification* des cultures sensibles « contaminées » par le bactériophage correspondant s'obtient, en effet, très aisément.

EXPÉRIENCES. — 2 tubes de bouillon sontensemencés, respectivement, avec un *staphylocoque* blanc et avec du *B. subtilis* (variété muqueuse). Après cinq heures de séjour à l'étuve, alors que le bouillon est nettement trouble, on ajoute, à chaque tube, II gouttes de bactériophage homologue. Après deux nouvelles heures à l'étuve on porte V gouttes du contenu de chaque tube dans des tubes contenant 6 parties de bouillon pour 1 partie de sérum anti-bactériophage homologue.

Les ensemencements faits le lendemain en bouillon et sur gélose montrent que dès le premier passage dans le milieu bouillon + sérum anti-bactériophage, la culture de *B. subtilis* est devenue « ultra-pure », c'est-à-dire qu'elle se trouve définitivement débarrassée du bactériophage contaminant. Avec le *staphylocoque*, le même résultat a été obtenu après deux passages par le milieu bouillon + sérum anti-bactériophage. Des titrages préalables avaient, du reste, montré que le sérum anti-bactériophage staphylococcique était moins actif que le sérum anti-bactériophage *subtilis*.

Tout autres furent les résultats obtenus au cours d'essais de *purification* du *B. megatherium* lysogène.

EXPÉRIENCES. — On prépare une série de tubes contenant 8,5 volumes de bouillon pour 1,5 volume de sérum anti-bactériophage *Megatherium*.

Le sérum employé dans cette série d'expériences étant très actif et neutralisant cent vingt fois son volume de bactériophage homologue, chaque tube contenait vingt fois plus de sérum qu'il n'en eût fallu pour neutraliser la totalité du bactériophage qui pouvait y être produit.

On ensemence du *B. megatherium* lysogène dans un premier tube de bouillon-sérum anti-bactériophage. Le développement est assez lent et n'atteint son maximum qu'au bout de plusieurs jours. Tous les deux ou trois jours, on fait un passage en portant un peu de la culture développée dans un nouveau tube de bouillon-sérum. Douze passages successifs furent ainsi réalisés dans le milieu bouillon + sérum anti-bactériophage *Megatherium*. Les cultures de ces divers passages, à partir du cinquième, furent examinées au point de vue de leur pouvoir lysogène. Voici les résultats obtenus :

I. La culture du cinquième passage en bouillon-sérum est ensemencée sur gélose. Le lendemain on fait une légère suspension avec la culture ainsi obtenue. I goutte de cette suspension mélangée à V gouttes de mutilat sensible en suspension épaisse fournit, à l'étalement sur boîte de Petri, 120 plages presque toutes pourvues, au centre, d'une très petite colonie de *B. megatherium*.

II. Une goutte de culture de sixième et de septième passages est ensemencée en gélose liquide qu'on coule en boîte de Petri ; I goutte, mélangée à une suspension épaisse de mutilat, est ensemencée par étalement sur la gélose d'une autre boîte. Pour les deux passages on obtient, d'une part, plusieurs milliers (4 à 5.000) de colonies ; d'autre part, une lyse presque complète avec des milliers de très petites colonies de *B. megatherium*. La culture de septième passage est éprouvée une seconde fois six jours plus tard (41) ; on ensemence I goutte de cette culture diluée à 1 p. 10 d'une part directement en gélose liquide, d'autre part, en mélange avec du mutilat sensible, par étalement sur gélose solidifiée. On obtient, d'un côté, 5.600 colonies de *B. megatherium* ; de l'autre, à peu près autant de plages, dans lesquelles on n'aperçoit pas de colonies de *B. megatherium* et qui pourraient donc être prises pour des plages vraies (42).

III. Une suspension très étendue de culture de dixième passage en eau physiologique fournit, en présence du mutilat sensible, 30 plages à colonies très petites de *B. megatherium*.

Contrairement à ce qui se produit pour les bactéries sensibles « contaminées » par un bactériophage, on ne parvient

(41) Le *B. megatherium* ne sporule pas dans le milieu bouillon + sérum, qu'il s'agisse de sérum normal ou anti-bactériophage.

(42) Ce fait montre combien il est difficile de se prononcer sur la nature exacte des plages. Dans cette expérience, en effet, il ne pouvait pas y avoir de bactériophages libres étant donné la présence de sérum anti-bactériophage en excès. Nous avons du reste observé des faits analogues avec des spores de *B. megatherium* lysogène chauffées à 85°. Dans les deux cas, l'absence de colonies visibles doit s'expliquer par la lenteur du développement du *B. megatherium* relativement à celui du mutilat.

donc pas à « guérir » un germe lysogène, même par de nombreux passages dans un milieu contenant du sérum antibactériophage correspondant : tous les germes conservent intégralement leur fonction lysogène après un tel traitement. Pourtant ici encore, nous l'avons vu, les bactériophages ne sont pas intracellulaires et sont, tout comme dans le cas des bactéries sensibles, exposés au contact direct du sérum et, par conséquent, neutralisés par celui-ci. Mais, contrairement à ce qui se passe pour les germes sensibles, les bactéries lysogènes sont résistantes à la lyse et la fonction lysogène, sous une forme ou phase autre que celle des corpuscules bactériophages, s'y trouve soustraite à l'action du sérum neutralisant. Nous allons montrer qu'il en est de même, au degré près, chez les bactéries sensibles devenues lysogènes et résistantes et que même chez les bactéries sensibles, les corpuscules bactériophages ne représentent qu'une phase particulière, extracellulaire, résistante au lysozyme, de la fonction lysogène.

On sait que les cultures sur gélose inclinée de bactéries sensibles, même abondamment additionnées de bactériophage homologue, sont presque complètement dépourvues de plages dans la partie supérieure, sèche, du milieu, alors que la lyse est totale sur le reste de sa surface.

EXPÉRIENCE. — Ensemençons du *B. subtilis* (variété muqueuse) additionné de son bactériophage sur quelques tubes de gélose sèche. La lyse est complète sur la partie inférieure du milieu alors que la partie supérieure porte une bordure de *B. subtilis*. On râcle avec précaution la couche bactérienne et on fait une suspension en eau physiologique. Étendue sur un nouveau tube de gélose, cette suspension donne une lyse complète, alors que traitée par le lysozyme (qui dissout le *B. subtilis*) elle se montre pratiquement dépourvue de facteurs lysogènes.

Les germes qui s'étaient développés sur la partie sèche de la gélose étaient donc bien dotés de fonction lysogène, mais celle-ci s'y trouve sous une forme autre que les corpuscules bactériophages et non décelable par le lysozyme.

Dès le début de nos expériences sur l'action du lysozyme, nous avons constaté que le bactériophage du *B. megatherium* fixé par le mutilat sensible n'est plus décelable par le lysozyme.

EXPÉRIENCE. — On ajoute IV gouttes de bactériophage de *Megatherium* à une suspension épaisse de mutilat en bouillon. Ce tube, ainsi

qu'un tube témoin contenant la même dilution de bactériophage en bouillon, sont portés à l'étuve. Les étalements faits sur boîtes de Petri, en présence de suspension épaisse fraîche de mutilat sensible donnent pour 0 c. c. 1 les résultats suivants :

1° Mutilat + Bactériophage *Megatherium* aussitôt : ± 1.000 plages.

2° Mutilat + Bactériophage *Megatherium* après 4 heures trente minutes : 60 plages.

3° Mutilat + Bactériophage *Megatherium* + Lysozyme après quatre heures trente minutes : 65 plages.

4° Témoin : Bactériophage en bouillon après six heures : ± 600 plages.

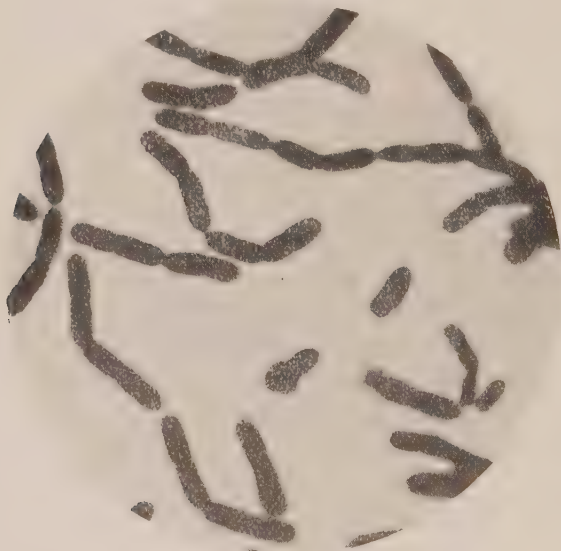


FIG. 4 a. — *B. megatherium* lysogène; forme sporogène.

Avec de faibles quantités de bactériophage en présence de suspension épaisse de mutilat, l'inactivation peut être définitive. Mais, même lorsque la suspension de mutilat en bouillon additionnée de bactériophage donne à l'ensemencement sur gélose une lyse plus ou moins prononcée, le lysozyme peut ne pas y déceler de bactériophages actifs. Nous voyons donc que chez des bactéries sensibles (*B. subtilis*, mutilat), tout comme chez les germes spontanément lysogènes, la fonction lysogène qui, dans les lysats et dans les filtrats, a pour support les corpuscules bactériophages, revêt, au sein des bactéries, un état différent non décelable par le lysozyme.

Cet ensemble de faits indique que les bactériophages ou facteurs lysogènes tels que nous les connaissons ne représentent qu'une phase dans l'évolution de ces éléments. Cette phase extracellulaire qu'on pourrait appeler phase des bactériophages « mûrs » ou actifs, matérialise, en quelque sorte, la fonction lysogène. Elle est caractérisée par l'état corpusculaire, l'aptitude à se fixer sur les bactéries sensibles et une résistance totale

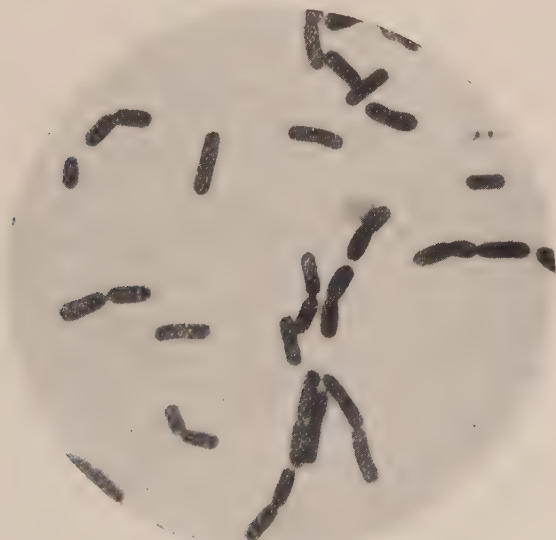


FIG. 4 b. — *B. megatherium* lysogène; forme asporogène.

à l'action du lysozyme. Son apparition semble bien être liée à la division des cellules bactériennes. En dehors de cette phase, la fonction lysogène est « inscrite dans la trame » (43) des germes lysogènes et aussi, nous l'avons vu, des germes sensibles impressionnés par le bactériophage, sous une forme qu'on ne décèle plus par l'action du lysozyme. Cette phase possède, en commun avec la phase extracellulaire active, une fonction antigène propre qui permet de l'identifier. Le passage de cette phase intracellulaire à la forme corpusculaire active

(43) BORDÈT (J.) et CIUCA (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **84**, 1921, p. 748.

semble avoir lieu au moment de la division cellulaire. C'est au processus inverse, c'est-à-dire au passage de la forme corpusculaire à la phase intracellulaire, que correspond l'inactivation des bactériophages au contact des bactéries homologues.

On voit qu'il n'y a pas, au point de vue des phénomènes en jeu, de différence fondamentale entre bactéries lysogènes et bactéries sensibles soumises à l'action des bactériophages homologues.

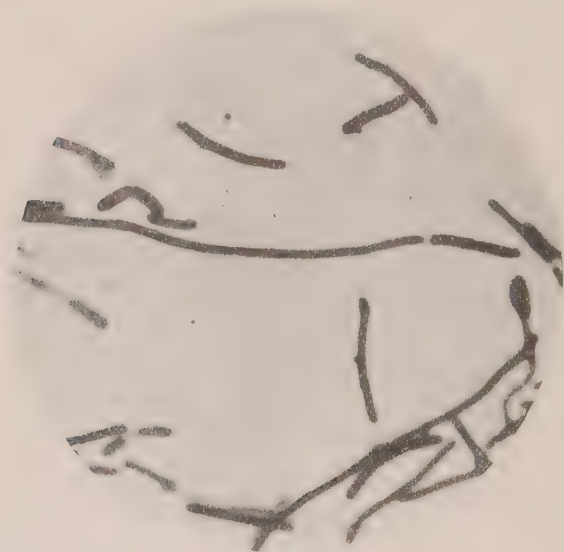


FIG. 4 c. — Mutilat : forme asporogène de *B. megatherium*, sensible au bactériophage de celui-ci.

Nous avons dit plus haut que le bactériophage du *B. megatherium* peut être définitivement inactivé en présence de la variété asporogène sensible (mutilat). Dans certains cas le mutilat soumis au contact du bactériophage et l'ayant inactivé garde ses caractères morphologiques (filaments fins, plus ou moins longs) [fig. 4 c] et physiologiques : il reste sensible à l'action du bactériophage. Dans d'autres cas il devient résistant sans avoir acquis la fonction lysogène. Enfin, dans d'autres cas encore, il devient, sous l'action du bactériophage, résistant et lysogène. Fait intéressant, le mutilat devenu résistant, comme celui devenu résistant et lysogène sous l'action du bactério-

A cette température les plages atteignent des dimensions considérables (1 cent. 5). La partie centrale, transparente, reste stérile au repiquage. L'anneau périphérique, translucide et granuleux montre, à l'examen microscopique, une lyse incomplète (filaments Gram-positifs et Gram-négatifs au milieu de débris bactériens) et fournit, au repiquage, des cultures légèrement plus translucides que celles de mutilat normal. Au cours des premiers repiquages ces cultures s'éclaircissent soit partiellement, soit en totalité, plus ou moins vite. Par la suite, elles prennent l'aspect ordinaire des cultures de mutilat : enduit gras de couleur jaune ou jaune gris.

Ces cultures se montrent résistantes à l'action du bactériophage du *B. megatherium*. En présence de mutilat normal une trace de ces cultures donne des milliers de plages : elles sont donc lysogènes. Dans beaucoup d'essais ces plages présentent presque toujours, au centre, une colonie de mutilat lysogène, ces colonies étant souvent à la limite de la visibilité ; dans d'autres cas les plages pourraient être prises pour des plages vraies, soit que les colonies centrales restent trop petites pour être visibles, soit, ainsi que nous le verrons par la suite, qu'il y ait eu fléchissement de la résistance du mutilat lysogène.

Avec une des souches de mutilat lysogène ainsi obtenues, on a réalisé, à un moment donné, 38 repiquages successifs sans qu'il y eût aucune modification dans l'aspect absolument normal des cultures. Brusquement, le trente-neuvième repiquage a montré une lyse marquée. On repart du trente-huitième et, de nouveau, la culture du trente-neuvième passage s'est lysée. De nouveaux essais furent institués en partant, respectivement, des trente-cinquième et trente-septième repiquages ; les cultures se sont éclaircies au trente-neuvième, avec lyse totale aux quarantième et quarante et unième passages. Ainsi, à quatre reprises différentes, des cultures qui avaient paru jusque-là parfaitement résistantes ont marqué, à un moment donné, un fléchissement prononcé de leur résistance au bactériophage.

On est reparti alors de la culture du vingt-quatrième repiquage

ture de 43°, la multiplication des germes sans qu'il y ait lyse, ni multiplication des facteurs lysogènes. Avec le bactériophage du *B. megatherium*, même à la température de 43° et 46° nous avons constamment obtenu la lyse du mutilat sensible (production de plages sur gélose).

Il y a longtemps déjà (ces *Annales*, 39, 1925, p. 809), nous avons signalé qu'avec le *B. Shiga* il n'y avait ni lyse, ni multiplication des bactériophages à la température de 46° à laquelle le *B. Shiga* ne se multiplie pas en bouillon.

conservée en gélose profonde. Les cultures successives sont normales jusqu'au quarante-neuvième repiquage ; celui-ci, ainsi que la culture de cinquantième repiquage, sont translucides et prennent un aspect vitreux ; le cinquante et unième repiquage reste définitivement stérile.

Le mutilat lysogène ne présente donc pas, au point de vue de la résistance à la lyse, la stabilité du *B. megatherium* lysogène. L'expérience suivante montre qu'il en est de même pour la fonction lysogène.

EXPÉRIENCE. — On prépare une série de tubes contenant 3 parties de bouillon pour 1 partie de sérum anti-bactériophage *Megatherium* (ce sérum neutralise cent fois son volume de bactériophage). Ainsi que nous l'avons décrit plus haut pour le *B. megatherium* lysogène, on fait, avec le mutilat lysogène, une série de passages par ce milieu en réensemencant tous les deux à trois jours. Avant ces passages, toutes les colonies (20 sur 20) de mutilat se sont montrées lysogènes. Après 6 passages par le milieu bouillon + sérum anti-bactériophage *Megatherium*, le mutilat est ensemencé sur gélose de manière à obtenir des colonies isolées ; 6 colonies sur 20 ainsi éprouvées se sont montrées dorénavant dépourvues de pouvoir lysogène.

Contrairement à ce que nous avons vu pour le *B. megatherium* lysogène, des passages répétés par le milieu bouillon + sérum antibactériophage permettent, dans le cas du mutilat rendu lysogène, d'obtenir une certaine proportion de germes ultra-purs. Le mutilat lysogène présente, sous ce rapport, un terme de passage entre les bactéries sensibles « contaminées » par le bactériophage et les germes spontanément lysogènes. Il est probable que, contrairement à ceux-ci, le mutilat rendu expérimentalement lysogène renferme une petite proportion de germes non lysogènes ; protégés par le sérum antibactériophage, ces germes peuvent se développer (45).

Gratia attribue à la faculté de sporuler la stabilité de la résistance et du pouvoir lysogène du *B. megatherium* lysogène. C'est possible. Nous pouvons dire pourtant que nous avons obtenu, par repiquages fréquents (46), une souche non sporulée de ce germe (fig. 4 b). Cette souche ne se différenciait

(45) Il y a lieu de rappeler ici des faits analogues en ce qui concerne les spores de germes spontanément lysogènes et celles de bactéries « contaminées ». Toutes les spores sont lysogènes dans le premier cas ; une partie seulement dans le second.

(46) Nous avons montré, il y a longtemps (ces *Annales*, 26, 1912, p. 620), qu'on pouvait obtenir, à partir de souches sporogènes, des

guère, ni par l'aspect des cultures, ni par les caractères microscopiques, du mutilat rendu lysogène. Pourtant la fonction lysogène a persisté chez la totalité des germes après 10 passages par le milieu bouillon + sérum antibactériophage *Megathetrium*.

Il est fort possible qu'on puisse obtenir, à partir de bactéries sensibles, des souches lysogènes beaucoup plus stables que le mutilat lysogène décrit plus haut. Ainsi que nous le disions, il semble y avoir toute une gamme, au point de vue de la résistance au bactériophage et, aussi, de la stabilité de la fonction lysogène, entre les bactéries sensibles simplement « contaminées » par le bactériophage et les germes spontanément lysogènes. Les expériences que nous avons rapportées, ainsi que des expériences analogues (centrifugations répétées et traitement par le lysozyme) instituées avec le mutilat rendu lysogène, montrent que dans tous ces cas les bactériophages, tels que nous les connaissons, ne représentent qu'une phase de la fonction lysogène et n'existent pas, comme tels, au sein des cellules bactériennes (bactéries lysogènes ou bactéries sensibles « impressionnées » par le bactériophage). Les corpuscules bactériophages qu'on trouve dans les cultures lysées ou non ne sont donc pas les descendants directs de bactériophages préexistants : *ils sont toujours reproduits par les cellules bactériennes*.

Considérées à la lumière de ces faits nouveaux, les expériences de Den Dooren de Jong sur la persistance de la fonction lysogène chez les spores chauffées (47), ainsi que les nôtres sur les spores traitées par des pressions élevées (48) prennent leur véritable signification, celle que le savant hollandais leur avait dès le début attribuée, à savoir : la preuve de la production *de novo* des bactériophages ou facteurs lysogènes par les bactéries issues de spores ainsi traitées. En réalité, cette production *de novo* se fait tant chez les bactéries sensibles que chez les bactéries spontanément lyso-

souches pratiquement asporulées en sélectionnant, par des repiquages répétés, faits à des intervalles appropriés, des germes ayant le moins de tendance à sporuler.

(47) Voir page 13.

(48) *C. R. Acad. Sc.*, **200**, 1935, p. 1072 ; ces *Annales*, **41**, 1936, p. 142.

gènes, et aussi bien pour celles issues de spores que pour les bactéries qui se multiplient par division. C'est précisément parce qu'on avait constaté, pour les premières (spores de *B. subtilis*), des faits en tous points superposables à ceux décrits par Den Dooren, qu'on avait pu mettre en doute l'interprétation donnée par ce savant. Or, nous venons de voir qu'entre les bactéries spontanément lysogènes et celles qui le sont rendues expérimentalement, ou mêmes les bactéries sensibles, il n'y a que des différences quantitatives. Toutes les bactéries d'une souche lysogène possèdent la propriété de produire des bactériophages ; toutes les spores donneront donc naissance à des colonies lysogènes. Cette propriété est, d'autre part, « inscrite dans la trame » de ces germes d'une façon particulièrement stable : les expériences de *purification* au moyen de sérum antibactériophage le montrent nettement. Mais partout, chez les bactéries sensibles comme chez les germes lysogènes, les bactériophages sont produits *de novo* et non par multiplication de bactériophages préexistants. Ce fait fondamental nous paraît totalement incompatible avec la notion d'un virus. Enfin, particularité importante, cette reproduction des bactériophages se fait, suivant l'expression anglaise, « true to type », c'est-à-dire que les éléments nouvellement produits le sont, chaque fois, avec leurs caractères propres et plus ou moins constants. C'est là la signature même des phénomènes héréditaires et qui justifie, semble-t-il, la conception que nous défendons.

Ainsi que nous le faisons remarquer ailleurs (49), l'individualisation des facteurs lysogènes n'est pas sans analogie avec les processus cellulaires dans lesquels on voit les supports des caractères héréditaires s'individualiser au moment de la division des cellules. Il est difficile, par contre, de trouver actuellement une analogie au phénomène connu depuis longtemps, de la fixation des bactériophages sur les germes homologues. Ce phénomène est un trait propre à la bactériophagie et confère à celle-ci son caractère d'« hérédité par contagion ».

Le fait qu'on ne parvient pas à déceler au moyen du lysozyme les bactériophages fixés, montre qu'il se produit, à ce moment, une modification importante dans le support de la

(49) *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 1937, p. 931.

fonction lysogène. La phase *bactériophage* ou *facteur lysogène*, phase corpusculaire, active, résistante au lysozyme, fait place à une autre, inactive, indécélable par le lysozyme.

Chez les germes lysogènes (spontanément ou secondairement), la modification du protoplasme cellulaire qui conditionne cette phase fait partie intégrante de la structure cellulaire. Chez les bactéries sensibles cette modification fait suite à la fixation des bactériophages. Dans les deux cas, elle se manifeste par l'aptitude à reproduire des corpuscules bactériophages au moment de la division cellulaire, ainsi que par la fonction antigène caractéristique de ces éléments.

Nous avons, en effet, montré que le *B. megatherium* lysogène pratiquement débarrassé, par des lavages répétés, des corpuscules bactériophages, conserve intégralement la fonction antigène propre de ceux-ci. D'autre part, une très belle expérience de Burnet (50) montre que des bactéries ayant fixé un bactériophage homologue participent, dorénavant, à sa fonction antigène. C'est ainsi que des bacilles dysentériques Flexner ayant fixé un bactériophage du groupe *B. coli* C, 16, sont dorénavant agglutinés par un sérum anti-bactériophage préparé avec celui-ci.

En somme, chez les germes lysogènes aussi bien que chez les bactéries sensibles, la fonction lysogène revêt deux phases différentes. La phase « bactériophage » ne provient pas directement de bactériophages préexistants, mais par l'intermédiaire d'une phase différente de celle que nous connaissons sous le nom de bactériophages ou facteurs lysogènes. C'est là un fait général dont les résultats de Den Dooren ont fourni un premier exemple et qui apporte, semble-t-il, la preuve tant cherchée et toujours contestée de l'origine endogène des bactériophages.

Nous ne reviendrons pas ici sur la conception que nous défendons, depuis de longues années, quant à la nature de ceux-ci. Rappelons seulement que les bactériophages se comportent, d'après nous, comme des supports de caractères cellulaires, comme des « facteurs » héréditaires lysogènes. Les faits exposés dans le présent mémoire et qui complètent les

(50) *Brit. Journ. Exp. Path.*, **14**, 1933, p. 93.

données apportées antérieurement sur la relation numérique entre bactéries et bactériophages, paraissent être en bon accord avec cette façon de voir.

Parlant de notre conception, Gratia dit (51) : « Wollman est adversaire à la fois de la théorie diastasique et de la théorie parasitaire ; mais il emprunte une partie à chacune d'elles pour édifier une théorie personnelle ». Or, ce n'est pas aux théories mais aux faits mêmes que nous empruntons les éléments de notre conception.

Structure corpusculaire, dimensions et propriétés physico-chimiques des bactériophages ; la faculté de reproduction ; leur autonomie, c'est-à-dire la constance de leurs caractères et l'indépendance relative de ceux-ci par rapport au support bactérien — autant de faits qui, à la rigueur, pouvaient s'interpréter dans la théorie parasitaire.

Lyse des bactéries sous l'action des bactériophages, et, surtout, origine endogène de ces éléments, sont d'autres faits qui cadrent avec la théorie diastasique. Ce dernier fait est, par contre, totalement incompatible avec la théorie parasitaire, comme le sont, du reste, les faits du premier groupe avec la théorie diastasique. Or, l'ensemble de ces faits s'interprète d'une façon satisfaisante dans la théorie des *facteurs héréditaires*, laquelle rend compte, par surcroît, de la relation numérique entre bactéries et bactériophages ainsi que du mécanisme de la reproduction de ces éléments exposé dans le présent mémoire.

Dès le début de nos recherches sur la bactériophagie (52), nous avons pensé que la théorie des *facteurs héréditaires* (gènes, dans ces cas-ci) pouvait s'appliquer à d'autres processus d'allure infectieuse et, notamment, aux tumeurs filtrables ainsi qu'à certaines « mosaïques » des plantes. En ce qui concerne ces dernières, une théorie analogue avait du reste été proposée, indépendamment, par Duggar et ses collaborateurs.

Gratia, lui aussi, avait « le sentiment d'une certaine analo-

(51) Ces *Annales*, **57**, 1936, p. 673.

(52) Ces *Annales*, **39**, 1925, p. 739 ; *Bulletin Inst. Pasteur*, **26**, 1928, p. 1.

gie entre les deux problèmes » (bactériophagie et mosaïques). A la suite de recherches qu'il entreprit en collaboration avec Manil, il aboutit à la conclusion « qu'il existe entre les deux problèmes une identité si parfaite jusque dans les moindres détails que toute conception, pour être exacte, doit être applicable à l'un comme à l'autre problème. Or, il résulte de nos recherches que l'agent actif des mosaïques est un élément exogène ».

Il nous paraît impossible de se rallier à cette opinion depuis les recherches, devenues vite célèbres de Stanley, sur l'isolement et la cristallisation de l'agent de la mosaïque du tabac (53). Cet agent se trouve être, en effet, une protéine de poids moléculaire extrêmement élevé (17.000.000). Or, on pouvait, à la rigueur, imaginer que des êtres autonomes, des inframicrobes parasites cellulaires obligés, pussent être réduits à un petit nombre de molécules différentes. Il ne paraît guère possible qu'ils soient constitués par une protéine pure ; de telles substances ne peuvent prendre naissance que comme produits cellulaires. L'« identité parfaite » dont parle Gratia se retourne donc contre l'hypothèse de virus exogènes, dans le cas de la bactériophagie.

Tout récemment, du reste, Northrop (54) a rapporté des essais de *purification* du bactériophage staphylococcique. Ici encore, l'agent actif serait une protéine de poids moléculaire considérable (500.000) ; cette substance déterminerait la lyse de staphylocoques en voie de développement à la dilution de 10^{-10} mgr. et se reproduirait, au cours de ce processus, avec ses caractères propres. Ces faits viennent, eux aussi, à l'appui de la conception d'après laquelle les bactériophages seraient des éléments d'origine endogène (55).

(53) *Science*, **81**, 1935, p. 644 ; *Journ. Biol. Chem.*, **115**, 1936, p. 673 ; *Am. Journ. Bol.*, **24**, 1937, p. 59.

(54) Stanley, ainsi que Gowen et Price rapprochent du reste, expressément, les agents actifs des « mosaïques », des gènes.

(55) C'est encore une protéine de poids extrêmement élevé (30.000.000) qui a été identifiée tout récemment comme étant l'agent du papillome infectieux du lapin (Shope). Il n'est pas sans intérêt de constater que c'est précisément dans les trois groupes de processus (bactériophagie, mosaïques des plantes, tumeurs filtrables) justiciables, d'après nous, de la conception des facteurs héréditaires, qu'on a pu actuellement mettre en évidence ces protéines actives.

RÉSUMÉ.

Les données quantitatives apportées dans notre dernier mémoire sont confirmées. A savoir : 1° Le titre bactériophagique des cultures en bouillon (faites dans les conditions courantes) est toujours relativement bas [10^3 - 10^5 ; rarement 10^6] (56) par comparaison avec le titre des lysats bactériophagiques (10^8 - 10^9) ; 2° Le titre bactériophagique des cultures sur gélose se trouve constamment être de même ordre (généralement un peu plus bas) que leur titre bactérien ; dans les conditions les plus favorables (cultures jeunes) les deux titres deviennent très sensiblement égaux, les suspensions préparées avec de telles cultures fournissant, après dissolution des bactéries par le lysozyme, autant de plages qu'elles contenaient de germes avant dissolution. La confrontation de nos données avec celles apportées sur les mêmes points par Gratia montre qu'il n'y a pas désaccord sur les faits.

Quant à l'interprétation, le désaccord est en grande partie apparent. Dans son travail paru en décembre 1936, Gratia ne tient compte, en effet, que des conclusions de notre dernier mémoire, à l'exclusion des données communiquées dès le mois de mai 1936.

Or, nous basant sur certains faits (absence de bactériophages dans les filtrats faits à partir de suspensions de *B. megatherium* lysogène en eau physiologique et leur présence en proportion déterminée, dans les mêmes suspensions dissoutes par le lysozyme ; production d'anticorps pour les bactériophages au moyen de spores lysogènes chauffées à 90°, nous avons admis, au début : 1° Que les corpuscules bactériophages existent comme tels au sein de bactéries lysogènes ; 2° Que les cultures sur gélose de *B. megatherium* lysogène ne contiennent que de tels bactériophages intracellulaires.

Assez vite nous avons reconnu que cette façon de voir ne correspondait pas à la réalité. Deux notes antérieures, ainsi

(56) C'est le titre de 10^5 que Gratia retrouve dans un travail tout récent : *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 1937, p. 903.

que le présent travail, tout en établissant la signification réelle des faits que nous venons de rappeler montrent que les corpuscules bactériophages n'existent pas comme tels au sein des bactéries lysogènes ; ces corpuscules représentent une phase particulière, extracellulaire, de la fonction lysogène.

Chez les bactéries spontanément lysogènes, ainsi que chez celles qui l'ont été rendues expérimentalement, cette phase corpusculaire, résistante au lysozyme (bactériophages ou facteurs lysogènes) est produite, à un moment donné, (fort probablement au cours de la division cellulaire) par des germes chez lesquels seules les propriétés antigènes décèlent l'existence de la fonction lysogène. De même pour les bactéries sensibles « contaminées » par le bactériophage correspondant, les corpuscules bactériophages qu'on retrouve dans le lysat ne sont pas les descendants directs des bactériophages contaminants ; entre les uns et les autres on trouve intercalée une phase inactive, ou tout au moins non résistante au lysozyme, de la fonction lysogène. On peut donc dire, dans ce sens, que les bactériophages ou facteurs lysogènes tels que nous les connaissons, sont toujours, aussi bien chez les germes lysogènes, que chez les bactéries sensibles, produits *de novo*.

On comprend, dans ces conditions, que les résultats obtenus avec les spores chauffées de germes sensibles « contaminés » par leur bactériophage, soient superposables aux résultats obtenus par den Dooren de Jong avec les spores chauffées de bactéries spontanément lysogènes. Dans l'un et l'autre cas il s'agit bien d'une production de bactériophages *de novo*, ainsi que le savant hollandais le maintenait dès l'abord.

Les corpuscules bactériophages n'existant pas comme tels au sein des bactéries lysogènes, les résultats numériques fournis par le lysozyme et rappelés plus haut ne sauraient s'expliquer par une « libération » proprement dite de ces corpuscules. Des expériences décrites au cours de ce travail paraissent en indiquer le mécanisme.

D'autres expériences portent sur les conditions de conservation du *B. megatherium* lysogène, ainsi que de son bactériophage dans les filtrats et dans les suspensions bactériennes en bouillon et en eau physiologique et tout particulièrement sur l'inactivation de ce bactériophage par les germes homologues

Une étude comparée est faite de certains phénomènes présentés par les germes spontanément lysogènes et les germes rendus lysogènes expérimentalement.

Les relations numériques entre bactéries et bactériophages confirmées dans ce travail ne sont guère compatibles avec la notion d'un virus parasite. L'existence de « phases » de la fonction lysogène et la production *de novo* des corpuscules bactériophages paraissent démontrer l'origine endogène de ceux-ci.

**CARACTÈRES DE L'ALLERGIE ET DE L'IMMUNITÉ
CONFÉRÉES AU COBAYE
PAR L'INOCULATION DE BACILLES MORTS
ENROBÉS DANS DE L'HUILE DE VASELINE**

par A. SAENZ.

*(Institut Pasteur, laboratoire de Recherches
sur la Tuberculose.)*

Des recherches de A. Boquet et L. Nègre [1], Petroff et Stewart [2] et dans la suite de A. Branch et J. R. Cuff [3], Crawford [4], et d'autres encore, il résulte que les bacilles tuberculeux morts sont capables de rendre le cobaye allergique à la tuberculine. Toutefois, les réactions allergiques sont irrégulières et n'atteignent jamais un degré aussi intense que celles produites par des bacilles vivants et virulents.

A. Boquet et J. Bretey [5] ont, en effet, démontré que si l'on inocule au cobaye 10 milligrammes de bacilles morts, l'allergie ne commence à se manifester qu'entre le huitième et le douzième jour et les réactions ne deviennent franchement nécrotiques qu'au treizième jour. Dans des circonstances identiques, la même souche de bacilles vivants et virulents donne des résultats superposables à la dose de 1/10.000 de milligramme.

Si au lieu de se servir d'eau physiologique comme excipient des bacilles morts, ainsi que l'ont fait les auteurs précités, on emploie, comme Coulaud (1934) [6], de la paraffine solide, ou bien de l'huile de vaseline d'après la technique que nous allons décrire (1935), on obtient un état allergique comparable à celui produit par les bacilles vivants et virulents.

Coulaud utilise de la paraffine solide dont le point de fusion oscille entre 42-44°, 46-48°, 54°. Il émulsionne, à raison de 3 à 5 centigrammes par centimètre cube, des bacilles tubercu-

leux humains ou bovins, tués préalablement par la chaleur humide à 120° ou incorporés à de la paraffine en ébullition les bacilles encore vivants ; il inocule le produit encore liquide, avant refroidissement complet [7], sous la peau de la masse musculaire du cou à des lapins ou des cobayes.

En procédant ainsi, Coulaud obtient un état allergique [8 et 9], qui se constitue entre le vingt-troisième et le trentième jour et dont l'intensité est véritablement extraordinaire. L'intradermo-réaction à la tuberculine brute et au 1/50, donne lieu chez le cobaye à une eschare de dimensions exceptionnelles, infiltration des téguments tellement importante qu'elle détermine la formation d'une masse indurée de 2 centimètres de diamètre. La durée de cette hypersensibilité est pratiquement infinie.

Etant donné que la paraffine ne diffère de l'huile de vaseline que par sa consistance et son point de fusion, nous nous sommes adressé à cette substance en vue d'étudier ses effets sur les bacilles vivants et morts dans la production de l'allergie et de l'immunité.

L'emploi de l'huile de vaseline en microbiologie date des expériences de Le Moignic et Pinoy [10] qui, depuis 1916, se sont servis de ce produit soit à l'état pur, soit en mélange avec de la lanoline dans des essais de vaccination anti-typhique ou dysentérique et d'autres maladies microbiennes non tuberculeuses. Les recherches de G. Ramon et de son école [11], sur l'enrobage des toxines diphtérique et tétanique dans des excipients gras selon la formule qu'il a préconisée, sont bien connues de tous.

En ce qui concerne la tuberculose, c'est Vallée [12] qui, le premier, entre 1923 et 1927, employa l'huile de vaseline dans des expériences de vaccination, avec des bacilles vivants, contre la tuberculose et l'entérite hypertrophiante des bovidés.

Mais, à notre connaissance, on n'avait pas encore étudié les caractères des réactions allergiques, produites chez le cobaye par l'enrobage des bacilles morts dans l'huile de vaseline, qui font l'objet de ce mémoire.

Technique de l'enrobage des bacilles morts dans l'huile de vaseline.

L'action de l'huile de vaseline sur les bacilles tuberculeux morts des mammifères a été recherchée avec des corps microbiens, souche bovine Vallée, préparés [43] suivant la technique décrite ci-dessous :

Des voiles de cultures en milieu synthétique de Sauton, à 38°, âgés de dix semaines, sont chauffés à 120° pendant vingt minutes. On se débarrasse du liquide par filtration sur papier Chardin, puis on lave abondamment les bacilles avec de l'eau distillée. Les corps microbiens sont complètement desséchés dans de grandes boîtes de Petri ; on arrive à ce résultat après quelques jours d'étuve à 38°. Ces bacilles sont ensuite finement pulvérisés par broyage à sec dans des mortiers. Toutes ces opérations sont faites aseptiquement.

Pour la préparation de l'émulsion en huile de vaseline, on procède comme suit :

10 centigrammes de corps microbiens sont déposés dans un petit mortier stérile, puis soigneusement mélangés à 10 cent. cubes d'huile de vaseline qu'on laisse tomber goutte à goutte tandis qu'on brasse énergiquement le mélange.

Dans ces recherches, nous avons employé l'huile de vaseline préalablement stérilisée.

En procédant ainsi, on obtient une émulsion d'apparence laiteuse et parfaitement homogène, contenant 1 centigramme de bacilles morts par centimètre cube. On a soin de la remuer de nouveau juste avant l'inoculation aux animaux.

Après cet enrobage, les bacilles n'ont pas perdu leur acido-résistance.

Nous nous sommes toujours servi de cobayes à pelage blanc, pesant de 400 à 500 grammes et dont le parfait état de santé avait été contrôlé par un séjour préalable d'une ou deux semaines dans les cages à expériences.

ACTION DE L'HUILE DE VASELINE SUR LES BACILLES TUBERCULEUX
DES MAMMIFÈRES.

VOIE SOUS-CUTANÉE OU INTRAMUSCULAIRE. — 80 cobayes furent inoculés par lots de 6 à 10, avec 1 cent. cube de l'émulsion microbienne, c'est-à-dire 1 centigramme de bacilles, par voie sous-cutanée ou dans la masse musculaire profonde de la cuisse [14].

L'inoculation intramusculaire de bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline détermine des lésions locales qui se traduisent tout d'abord par la formation d'un abcès assez volumineux qui apparaît en moyenne entre trente et soixante-dix jours s'accompagnant d'une hypertrophie des ganglions poplités, inguinaux et lombaire correspondants.

Sur la coupe, ces ganglions montrent une dégénérescence fibreuse, mais jamais de fonte caséuse.

L'abcès, dont l'évolution se prolonge pendant plusieurs mois, s'ouvre parfois à l'extérieur, et donne issue à un pus caséux qui est infecté dans la suite par des microbes de la flore secondaire banale. L'examen microscopique du pus montre la présence de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles à divers degrés de dégénérescence, de macrophages et de masses amorphes acido-résistantes constituées par des débris de bacilles. Ce pus a un aspect luisant par suite de la présence de l'huile qui reste *in situ* pendant de longs mois, comme nous avons pu le constater chez des animaux sacrifiés ou morts de maladie intercurrente, entre trente et deux cent quatre-vingts jours après l'inoculation.

Les cobayes inoculés furent soumis périodiquement à l'intradermo-réaction (1/10 ou 2/10 de centimètre cube d'une dilution de tuberculine brute au 1/10), à plusieurs jours d'intervalle. La lecture des résultats est faite entre vingt-quatre et quarante-huit heures

Des séries de cobayes identiques, témoins, furent inoculées dans les mêmes conditions que précédemment, mais avec des bacilles morts émulsionnés dans l'eau physiologique.

Au cours d'un grand nombre d'expériences maintes fois

répétées, voici la moyenne des résultats que nous avons constatés :

Les cobayes, préparés avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline, réagissent déjà à la tuberculine par une papule oedémateuse rouge, d'environ 20 sur 23 millimètres, entre le sixième et le huitième jour. Cette réaction devient nécrotique ou hémorragique, mesurant environ 20 sur 23 millimètres du quinzième au vingtième jour ; son degré d'intensité augmente encore, entre le vingt-cinquième et le cinquantième jour qui suit l'inoculation.

La figure 4 représente une de ces réactions.

Dans le même délai, aucun des animaux témoins, ayant reçu des bacilles morts émulsionnés dans l'eau physiologique ne devint allergique.

Au cours de ces expériences, 10 milligrammes de corps microbiens nous ont paru la dose optima pour atteindre les résultats voulus. Des quantités supérieures ne semblent devoir influencer ni la durée de la période anté-allergique, ni l'intensité de la réaction : divers lots réunissant 15 cobayes, ayant reçu 2 à 3 centigrammes de corps microbiens enrobés dans l'huile de vaseline, ont donné des résultats superposables au précédent.

Un des caractères les plus frappants de cette allergie est qu'une fois arrivée à son acmé, elle conserve la même intensité pendant de longs mois. La progression ascendante de l'allergie a pu être suivie selon la méthode de A. Boquet et J. Bretey, par la recherche de la dose minima décroissante de tuberculine encore susceptible de donner des réactions dermiques locales franchement positives. L'allergie augmente encore d'intensité du vingtième au soixante-dixième jour ; à partir de cette date, elle reste stationnaire, en plateau, pendant plus d'une année durant laquelle, elle ne varie que dans des proportions insignifiantes : des lots de cobayes, inoculés avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline, dont nous avons titré la sensibilité tuberculinique, montraient, entre le cinquantième et le deux cent soixante-seizième jour une réaction nécrotique à la dilution de 1/10.000 de tuberculine brute, et une papule à centre nécrotique à 1/20.000. Nous verrons plus loin que des animaux, ayant fourni

des réactions particulièrement intenses, étaient encore positifs à des dilutions de tuberculine encore plus faibles (1/300.000 à 1/400.000).

Si nous comparons ces résultats avec ceux de A. Boquet et J. Bretey, dans l'étude de l'évolution de l'allergie dans la tuberculose expérimentale, on constate que l'allergie produite par les bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline est au moins aussi intense — quelquefois plus — que celle provoquée par



FIG. 1. — Réaction du type nécro-hémorragique, observée vingt jours après l'inoculation sous-cutanée de 1 centigramme de bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline. (Photo I.P.)

les bacilles vivants et virulents simplement mis en suspension dans l'eau physiologique.

D'ailleurs l'accroissement du degré allergique, déterminé par l'enrobage dans l'huile de vaseline, est également démontré par le fait que nous avons réussi à sensibiliser nettement des cobayes par ce moyen, avec des doses de bacilles morts allant de 1/10 à 1/100 de milligramme.

Or, dans les expériences de A. Boquet et J. Bretey, les bacilles morts suspendus dans l'eau cessent de sensibiliser le cobaye à la tuberculine, à des doses inférieures à 1/10 de milligramme (pris à l'état humide).

Bien entendu, dans ce cas, la période anté-allergique est plus longue et l'intensité de la réaction moindre que lorsque nous avons employé des doses élevées de germes.

PHÉNOMÈNE DE KOCH PAR VOIE INTRADERMIQUE. — Des lots de cobayes, rendus fortement allergiques par l'inoculation sous-cutanée de bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline, furent éprouvés, entre quarante et cent trente jours, par voie



FIG. 2. — Phénomène de Koch à son quatrième jour, obtenu par l'inoculation intradermique de 1/10 de milligramme de la souche bovine Vallée, chez un cobaye préparé quarante-deux jours auparavant avec 1 centigramme de corps microbiens morts de la souche homologue, enrobés dans l'huile de vaseline.

Cette réaction est identique à celle produite par l'inoculation de 1/10 de tuberculine brute au 1/10, chez le même animal. (Photo I.P.)

intradermique avec des bacilles vivants de souche homologue à des doses décroissantes allant de 1 milligramme à 1/10 de milligramme, dilué dans 1/10 de cent. cube.

Tous ces animaux répondirent, dès le lendemain, par un phénomène de Koch typique, qui à quarante-huit heures était caractérisé par une large infiltration de 20 à 25 millimètres environ, nécrotique ou hémorragique, qui se recouvrit dans la suite d'une eschare dont la chute laissa place à une cicatrice.

trice étoilée indélébile. Un de ces phénomènes de Koch se trouve représenté sur la figure 2.

Nous sommes arrivé à des résultats identiques pour l'obtention du phénomène de Koch, avec des germes morts de la souche homologe, inoculés par voie intradermique.

Rôle de la voie d'inoculation.

VOIE INTRAPULMONAIRE. — Nous sommes arrivé très facilement, étant donné la densité et la consistance de l'huile de vaseline employée comme excipient des bacilles morts, à infecter des cobayes par voie intrapulmonaire de la manière suivante :

A des animaux, laissés à jeun, depuis vingt-quatre heures, on donne au moyen d'une pipette à ingérer 3 centigrammes de corps microbiens enrobés dans 3 cent. cubes d'huile de vaseline ; pour cela, on leur place la pipette dans l'arrière-gorge en effectuant une légère pression sur leur thorax de façon à les obliger à faire des inspirations profondes.

Cette opération peut s'effectuer en deux ou trois fois, 1 centigramme par ingestion, à quarante-huit heures d'intervalle. Mais qu'il s'agisse d'inhalation unique ou fractionnée, par ce procédé simple, les bacilles pénètrent directement dans le tissu pulmonaire, comme le prouvent les résultats obtenus.

Entre le treizième et le quinzième jour, deux lots de cobayes ainsi préparés réagissaient déjà nécrotiquement à la tuberculine. Certains d'entre eux, qui montraient une réaction ecchymotique à la dilution de 1/10 de tuberculine brute au 1/10, réagissaient encore nécrotiquement à 1/10.000 de tuberculine brute.

La figure 3 illustre une de ces réactions.

Les lésions produites par l'inoculation intra-pulmonaire, restent cantonnées à l'arbre broncho-pulmonaire qui présente une hypertrophie, quelquefois très marquée, des ganglions trachéo-bronchiques, et des foyers de broncho-pneumonie caséuse, à différents degrés d'évolution comme le confirment les coupes histologiques. Le foie, la rate et les reins ainsi que les ganglions cervicaux, mésentériques et cœcaux, sont normaux.

Les animaux qui réagissent nécrotiquement ou hémorragiquement à la tuberculine (dimensions de la réaction de 23 sur 30 millimètres), sacrifiés au sixième mois de l'infection, présentaient ces foyers caséeux particulièrement sévères dans les lobes supérieurs et antérieurs des poumons.

Par ce procédé, on arrive d'ailleurs très aisément à produire des pneumonies caséeuses mortelles, entre soixante-dix et quatre-vingt-dix jours, avec des doses massives de 2 à 3

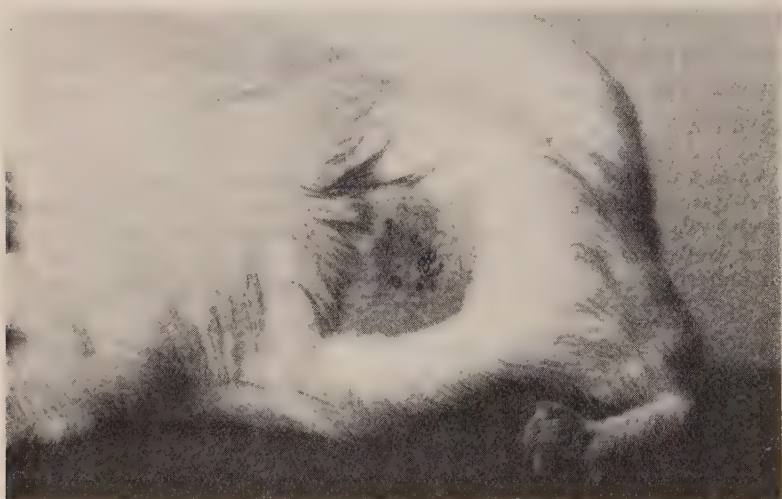


FIG. 3. — Réaction allergique ecchymotique obtenue chez un cobaye vingt-trois jours après l'inoculation intrapulmonaire de 1 centigramme de bacilles morts enrobés dans de l'huile de vaseline.

Dimensions de la réaction après quarante-huit heures : 22 sur 26 millimètres.

La nécrose centrale a formé une eschare qui est tombée six jours après l'épreuve intradermique.

Cette réaction était déjà nécrotique le quinzième jour.

La réaction allergique se révéla nécrotique jusqu'à la dose de 1/10.000 de tuberculine brute. (Photo I. P.)

centigrammes de bacilles morts toujours enrobés dans l'huile de vaseline.

Ces faits nous montrent donc la facilité avec laquelle on provoque l'infection des voies aériennes profondes au moyen de l'huile de vaseline. Par sa consistance, cette substance maintient les bacilles au contact du parenchyme pulmonaire

en déterminant des réactions allergiques spécifiques dont l'intensité dépend aussi de la quantité de germes inhalés

VOIE INTRATESTICULAIRE. — L'inoculation intratesticulaire de 1 centigramme de bacilles morts, enrobés dans 1 cent. cube d'huile de vaseline, s'avère particulièrement sévère.

Entre quinze et vingt-cinq jours, il se produit une énorme hypertrophie de l'organe qui dans des délais variables subit une fonte purulente. La période anté-allergique est plus courte, cinquième jour, mais surtout la réaction parvient à son acmé plus rapidement que par les autres voies.

Les réactions allergiques ou hémorragiques s'observent, dans un fort pourcentage des animaux ainsi inoculés, dès le treizième jour.

*
* *

Maintenant, nous sommes en mesure de décrire certaines réactions tuberculiques particulièrement intenses [15], franchement hémorragiques, apparues parfois dès le treizième jour et dont les caractères sont les suivants :

Six à huit heures après l'intradermo-réaction à la tuberculine apparaît une tache œdémateuse dont les dimensions importantes ne sont pas en rapport avec la quantité de tuberculine injectée ; après vingt-quatre heures, cette réaction est représentée par un grand placard hémorragique, entouré d'un bourrelet œdémateux nettement limité, de 35 à 45 millimètres de diamètre. A ce moment, la peau de l'animal est tellement endommagée que, si on essaie de l'épiler à cet endroit, l'épiderme se détache en donnant lieu à des suffusions sanguines. Sur cette tache hémorragique apparaissent, entre vingt-quatre et quarante-huit heures, des zones de nécrose et d'ecchymose déterminant la formation d'une eschare qui finit par tomber au bout de dix à douze jours, laissant une cicatrice indélébile.

Les figures 4 et 5 montrent des réactions de ce type.

Ces réactions allergiques, comme nous pouvons le constater sur les figures précédentes, rappellent par leurs dimensions et leur aspect hémorragique le phénomène de Sanarelli-Shwartzman [16 et 17].

Variables suivant les voies d'inoculation employées, elles

ont été observées plus précocement chez les animaux préparés par voie pulmonaire et intratesticulaire (treizième jour) que chez ceux préparés par voie sous-cutanée ou intramusculaire (trente-quatre à quatre-vingts jours).

De même, la proportion des animaux ayant ainsi réagi a varié de 50 p. 100 pour la voie testiculaire à 26 p. 100 pour la voie pulmonaire et 44 à 45 p. 100 pour les voies sous-cutanée et intramusculaire.



FIG. 4. — Réaction hémorragique chez un cobaye, treize jours après l'inoculation intratesticulaire de 1 centigramme de bacilles morts, souche bovine Vallée, enrobés dans de l'huile de vaseline; réaction observée vingt-quatre heures après l'épreuve intradermique à la tuberculine. (Photo I. P.)

Au cours de ces expériences, nous nous sommes naturellement assuré que l'huile de vaseline seule était incapable de sensibiliser le cobaye à la tuberculine ou de provoquer une réaction quelconque, même lorsqu'elle est injectée au niveau du foyer tuberculeux.

Les animaux rendus allergiques par des injections de bacilles morts dans l'huile de vaseline, ne réagissent pas non plus à l'inoculation dermique d'huile.

Comme les cobayes préparés avec des bacilles morts émulsionnés dans l'eau physiologique, ceux préparés avec de l'huile de vaseline par voie sous-cutanée, intramusculaire, plantaire ou intratesticulaire résistent impunément à l'injection sous-cutanée de 40 à 100 centigrammes de tuberculine brute. Par contre, dans les mêmes conditions, alors que les réactions allergiques sont à leur acmé (cinquante à quatre-vingts jours), les animaux préparés par la voie pulmonaire succombent, huit à

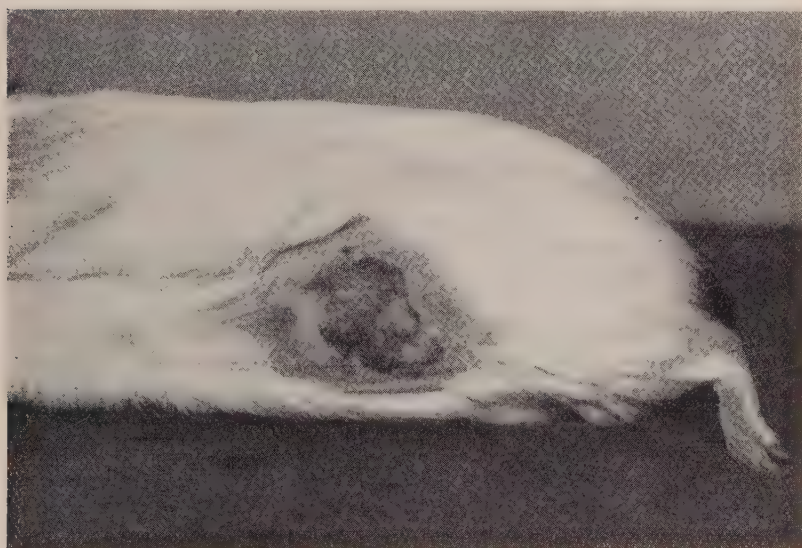


FIG. 5. — Réaction allergique hémorragique vingt-quatre heures après l'épreuve intradermique à la tuberculine, chez un cobaye inoculé, par voie sous-cutanée, trente-quatre jours auparavant avec 1 centigramme de bacilles tuberculeux morts, provenant d'une souche récemment isolée, enrobés dans l'huile de vaseline.

La réaction allergique se révèle nécrotique jusqu'à la dose de 1/30.000 de tuberculine brute. (Photo I.P.)

vingt-quatre heures après l'injection de 30 à 40 centigrammes de tuberculine brute à une intoxication tuberculinique. A l'autopsie, on constate des foyers de congestion particulièrement intenses uniquement localisés à l'arbre pulmonaire.

Toutes les constatations se rapportant à la date d'apparition et à l'évolution de l'allergie, chez 120 cobayes préparés avec

des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline, par différentes voies, sont résumées dans le tableau ci-joint.

Apparition et progression de l'allergie chez 120 cobayes inoculés avec 1 centigramme de corps microbiens morts, souche bovine Vallée, enrobés dans 1 cent. cube d'huile de vaseline.

VOIE d'inoculation	RÉSULTATS DES INTRADERMO-TUBERCULINATIONS
Sous-cutanée ou intramusculaire.	<p><i>Cinquième jour</i> : négatives, 32 p. 100; faiblement positives, papule œdémateuse, 68 p. 100.</p> <p><i>Huitième jour</i> : négatives, 6 p. 100; papules, 33 p. 100; franchement positives, 59 p. 100.</p> <p><i>Treizième jour</i> : franchement positives, 71 p. 100; nécrotiques, 29 p. 100.</p> <p><i>Seizième jour</i> : franchement positives, 42 p. 100; nécrotiques, 58 p. 100.</p> <p><i>A partir du vingtième jour et jusqu'au quatre cent cinquantième jour</i> : réactions nécrotiques ou hémorragiques. Dans ce groupe, il faut signaler 11 à 15 p. 100 de réactions hémorragiques particulièrement intenses qui par leurs caractères rappellent le phénomène de Sanarelli-Schwartzman.</p>
Intrapulmonaire.	<p><i>Cinquième jour</i> : négatives, 12 p. 100; faiblement positives, 58 p. 100; papule nette, 30 p. 100.</p> <p><i>Huitième jour</i> : papule, 63 p. 100; nettement positives, 14 p. 100; papule à centre nécrotique, 23 p. 100.</p> <p><i>Treizième au quinzième jour</i> : nettement positives, 40 p. 100; nécrotiques, 64 p. 100; hémorragiques, 26 p. 100.</p> <p><i>A partir du vingtième et jusqu'au deux cent cinquantième jour</i> : nécrotiques ou hémorragiques.</p>
Intratesticulaire.	<p><i>Cinquième jour</i> : négatives, 10 p. 100; faiblement positives, 66 p. 100; papules nettes, 24 p. 100.</p> <p><i>Huitième jour</i> : faiblement positives, 43 p. 100; franchement positives, 23 p. 100; papule à centre nécrotique 34 p. 100.</p> <p><i>Treizième au quinzième jour</i> : franchement positives, 5 p. 100; nécrotiques, 43 p. 100; hémorragiques, 50 p. 100.</p> <p><i>Vingtième au cent quatre-vingtième jour</i> : nécrotiques ou hémorragiques.</p>

Les faits marquants qui ressortent à la lecture de ce tableau sont les suivants :

L'enrobage dans l'huile de vaseline détermine une augmentation de l'allergie qui se traduit par un raccourcissement de la période anté-allergique et par une augmentation de l'intensité de la réaction.

Le degré de cette allergie est au moins aussi intense que celui produit par les bacilles tuberculeux vivants et virulents.

La durée de la période anté-allergique et l'intensité de l'allergie varient légèrement avec la voie d'inoculation empruntée. L'allergie apparaît dès le cinquième jour chez les animaux inoculés par voie intratesticulaire ou pulmonaire, et entre le sixième et le huitième jour chez les cobayes préparés par voie sous-cutanée avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline.

Arrivée à son acmé, l'allergie demeure invariable au moins pendant quatre cent cinquante jours durant lesquels la réaction tuberculinique s'est maintenue nécrotique ou hémorragique.

Action de l'huile de vaseline sur les variétés « R » et « S » des souches aviaires.

Le mode d'obtention et la description complète des variétés dissociées du bacille aviaire ont déjà été décrites ailleurs [18].

Des lots de cobayes reçoivent par voie intramusculaire [19] 10 milligrammes de la variété R ou S d'une souche aviaire isolée d'une poule tuberculeuse et encore virulente.

Les corps microbiens proviennent de cultures sur milieu de Sauton, âgées de dix semaines ; ils sont chauffés à 120° pendant vingt minutes, filtrés, desséchés et émulsionnés dans l'huile de vaseline comme il a été indiqué plus haut.

Les animaux inoculés, que ce soit avec la variété R ou S, commencent à réagir à la tuberculine dès le huitième jour. Au trentième jour, la réaction est nécrotique ou hémorragique, de 18 sur 23 millimètres. Au bout de soixante jours, les animaux réagissent encore nécrotiquement à 1/1.000 de tuberculine brute et par une belle papule à 1/2.000. Cette allergie n'avait aucunement diminué cent vingt jours après l'inoculation, date de la dernière épreuve intradermique.

PHÉNOMÈNE DE KOCH, PAR VOIE INTRADERMIQUE. — Les animaux inoculés avec les variétés R et S du bacille aviaire ont été éprouvés à maintes reprises, entre le quatre-vingtième et le cent-vingtième jour avec des bacilles morts, souche bovine Vallée, par voie intradermique.

Vingt-quatre à quarante-huit heures après l'injection de 1/10 de milligramme, on observe une infiltration œdémateuse de 12 sur 15 millimètres à centre nécrotique ; avec 1/100 de milligramme apparaît une papule rouge de la grosseur d'un pois ; la réaction limite a lieu avec 1/1.000 de milligramme et elle a consisté en une petite papule à centre bombé de la grosseur d'une lentille.

Des cobayes témoins inoculés avec les mêmes variétés R et S aviaires, dans des conditions identiques mais simplement émulsionnées en eau physiologique, n'ont accusé qu'une allergie insignifiante dans 25 p. 100 des cas.

Dans l'ensemble, les expériences avec les bacilles morts aviaires confirment les faits que nous avons enregistrés avec les bacilles des mammifères.

L'enrobage dans l'huile de vaseline se traduit par un accroissement du pouvoir allergique qui se manifeste surtout par une augmentation de l'intensité des phénomènes réactionnels généraux ou locaux. En effet, enrobés dans cette substance, les bacilles aviaires morts, inoculés au cobaye, déterminent un phénomène de Koch et une allergie superposables à ceux observés avec des bacilles aviaires vivants et virulents, simplement émulsionnés en eau physiologique.

Naturellement, les réactions allergiques restent moins intenses avec les bacilles aviaires morts, même enrobés dans l'huile de vaseline, qu'avec les bacilles des mammifères morts.

Il ressort de ces faits que l'allergie est plus intimement liée à la qualité de l'antigène employé qu'au degré des lésions produites par les germes inoculés. Cette conception vient à l'appui des observations de A. Boquet qui a démontré que le développement de l'allergie dépend moins de la virulence du germe et de l'étendue des lésions spécifiques que de la qualité de l'antigène injecté.

Action de l'huile de vaseline sur les bacilles paratuberculeux.

Trois lots de 8 cobayes sont inoculés par voie sous-cutanée ou intramusculaire avec des bacilles paratuberculeux de la fléole [20], provenant d'une culture en milieu synthétique de Sauton, âgée de huit semaines. La préparation des corps microbiens et leur enrobage dans

l'huile de vaseline ont été effectués comme pour les bacilles des mammifères.

Six des animaux du premier lot ayant reçu 1 centigramme présentent une réaction à la tuberculine franchement positive du treizième au quinzième jour qui se traduit par une belle papule œdémateuse de 12 sur 22 millimètres.

Les animaux du deuxième lot, inoculés avec 2 centigrammes de corps microbiens, donnèrent des résultats sensiblement identiques sauf 2 cobayes qui réagirent plus intensément par une papule à centre nécrotique, mesurant 20 sur 30 millimètres.

Le troisième lot comprend des cobayes inoculés avec 3 centigrammes. L'allergie à la tuberculine se manifeste au début comme pour les animaux des deux premiers groupes ; seulement à partir du trentième jour, la réaction devient franchement nécrotique de 20 sur 30 millimètres, chez 3 animaux sur 8. Le degré de l'allergie — caractère que nous avons déjà signalé pour les bacilles morts des mammifères émulsionnés dans l'huile de vaseline — n'a pas varié pendant un délai d'observation de plusieurs mois.

A partir de 3 centigrammes, l'augmentation de la dose n'influence plus ni la durée de la période anté-allergique, ni l'intensité de la réaction.

D'autres expériences, effectuées avec un bacille paratuberculeux de la tortue (Friedmann, 1903) et avec une souche de bacilles acido-résistants saprophytes provenant de l'homme, à part quelques variantes inhérentes à la qualité de l'antigène employé, ont confirmé pleinement ces constatations.

Cinq séries d'animaux, inoculés simultanément avec les souches précédentes, dans les mêmes conditions, mais émulsionnées en eau physiologique, n'ont réagi à la tuberculine que d'une façon fugace ou nulle pendant toute la durée de l'expérience.

En fait, l'enrobage dans l'huile de vaseline des bacilles paratuberculeux se traduit par un accroissement du pouvoir allergisant ; mais comme on devait s'y attendre, étant donné la sensibilité tuberculinique médiocre développée par ces germes, ici la période anté-allergique est plus longue et l'intensité de la réaction est plus faible que chez les cobayes préparés dans les mêmes conditions avec les bacilles des mammifères.

Action de l'huile de vaseline sur les germes sensibilisants.

Nous avons également recherché si l'augmentation de l'allergie produite par l'enrobage dans l'huile de vaseline se limitait aux germes du groupe *Mycobacterium* et, dans ce but, nous avons essayé son action sur d'autres microbes sensibilisants, non acido-résistants, tels que le bacille de Malassez et Vignal, le bacille morveux, *Brucella melitensis* et *abortus* [21].

BACILLE MORVEUX. — Des bacilles morveux, souche Nicolle, tués par l'éther, puis desséchés et traités comme les bacilles tuberculeux, dans de l'huile de vaseline, sont inoculés à raison de 1 centigramme par animal à 3 lots de cobayes, différents suivant la voie d'injection qui fut soit intrapulmonaire, soit sous-cutanée, soit intratesticulaire.

Des intradermo-réactions à la malléine (0 c. c. 4 d'une solution au 1/10), effectuées périodiquement permirent de constater une période anté-allergique d'une durée de treize à quinze jours.

Les animaux inoculés, par voie sous-cutanée, réagirent par une papule d'intensité variable dont le degré resta sensiblement le même au cours des épreuves ultérieures.

Les cobayes inoculés par voie pulmonaire ou testiculaire donnèrent, au bout du vingt-cinquième jour, une réaction franchement positive, papule avec centre nécrotique. Cette intensité se conserva pendant trois mois, date à partir de laquelle elle commença à décroître progressivement.

Trois séries de cobayes inoculés dans les mêmes conditions, par des voies identiques, avec la même souche de bacilles morveux mais mis en suspension dans l'eau physiologique n'ont pas réagi à la malléine.

Brucella. — Des corps microbiens, souche *Brucella melitensis* (1), tués par l'alcool-éther, puis desséchés et émulsionnés

(1) Nous devons à l'obligeance de M. Césari, que nous tenons à remercier ici, les corps microbiens des souches de bacilles morveux et de *Brucella melitensis* de la collection de Maurice Nicolle.

dans de l'huile de vaseline sont inoculés, à raison de 1 centigramme par animal à 2 lots de cobayes, par voie sous-cutanée ou intratesticulaire.

Les animaux, éprouvés à la mélitine, dans la proportion de 50 p. 100, ont réagi dès le neuvième jour. L'intensité de la réaction a augmenté jusqu'au trentième jour ; à ce moment, elle était représentée par une belle papule de 43 sur 22 millimètres, dimensions qui se sont conservées dans les épreuves suivantes pendant environ trois mois.

On a aussi recherché l'allergie chez ces mêmes animaux mais avec une émulsion bactérienne de *Brucella abortus*, préparée selon la technique de Sarnowicz [22], et les résultats obtenus — papule à centre nécrotique — furent plus accentués qu'avec la mélitine.

Une deuxième série de cobayes inoculés comme précédemment, par voie sous-cutanée, mais avec une souche de *Brucella abortus*, variété suis « Lister », a donné des résultats sensiblement identiques.

Des *Brucella melitensis* et *abortus* simplement émulsionnés en eau physiologique n'ont pas sensibilisé deux lots de cobayes qui servaient de témoins à cette expérience.

PSEUDO-TUBERCULOSE A BACILLES DE MALASSEZ ET VIGNAL. --

Dans ces essais, nous avons utilisé des corps microbiens dont la préparation fut légèrement différente de celle employée pour les bacilles dont il a été question plus haut.

Plusieurs souches de coccobacilles de Malassez et Vignal récemment isolées, furent ensemencées sur gélose simple dans des boîtes de Roux. Après six jours d'étuve, on prélève par raclage les cultures développées qu'on émulsionne en eau physiologique à raison de 100 cent. cubes par boîte. Cette émulsion mère est ensuite additionnée de formol dans la proportion de 3 p. 1.000 puis déposée à nouveau, pendant quinze jours, à l'étuve dans des ballons scellés. Au moment de l'emploi, on centrifuge et on pèse, à la balance, les corps microbiens qu'on émulsionne dans l'huile de vaseline, dans la même proportion que pour les expériences antérieures.

L'allergie fut recherchée, dans un lot de cobayes qui avaient reçu 1 centigramme de bacilles enrobés dans l'huile de vaseline, par voie sous-cutanée, au moyen d'extraits glycélinés.

préparés comme la tuberculine brute, à partir de cultures en bouillon de bacilles de Malassez et Vignal.

Ces animaux devinrent franchement allergiques : belle papule de 15 sur 20 millimètres, vingt-cinq jours après l'inoculation, tandis qu'un autre lot de cobayes témoins, qui avaient reçu simultanément les mêmes germes émulsionnés en eau physiologique, ne furent pas sensibilisés.

Les expériences que nous venons de résumer montrent que l'enrobage dans l'huile de vaseline de germes morts autres que les bacilles tuberculeux, tels que les agents de la morve, de la brucellose ou de la pseudo-tuberculose de Malassez et Vignal, se traduit par une augmentation des réactions allergiques comme pour les bacilles tuberculeux et paratuberculeux.

Dans le même ordre d'idées, H. Velu, G. Zottner et C. Sarthou ont observé [31] chez la vache, le mouton, l'âne et le cheval, avec des germes tués de *B. abortus*, enrobés dans des excipients gras, des réactions allergiques d'intensité égale à celles produites par les bacilles vivants tandis que les témoins, inoculés avec des bacilles morts émulsionnés dans l'eau ne présentaient que des réactions très faibles ou nulles.

Influence des excipients gras d'origine végétale ou animale sur l'allergie conférée par les bacilles morts.

Devant les résultats obtenus avec l'huile de vaseline, il s'imposait de rechercher les effets produits par l'enrobage des bacilles morts dans d'autres excipients gras d'origine végétale ou animale [23].

Dans ce but, plusieurs lots de cobayes ont été inoculés, par voie intramusculaire, avec toujours la même dose de bacilles tuberculeux morts ou desséchés, souche bovine Vallée, enrobés d'après la technique déjà décrite, dans du jaune d'œuf, de la lanoline, de l'huile d'olive ou d'arachide.

L'allergie, recherchée chez les animaux inoculés avec du jaune d'œuf, n'a accusé pendant une période de sept mois aucune augmentation par rapport à des animaux témoins n'ayant reçu que des germes émulsionnés en eau physiologique.

Seuls les lots de cobayes inoculés avec l'huile d'arachide ou d'olive montrèrent le vingtième jour une papule, réaction qui

devint nécrotique entre quarante-cinq et soixante jours ; ce dernier résultat contraste avec celui observé chez les témoins qui, à cette date, ne montraient qu'une simple papule.

Etant donné la faible augmentation de l'allergie constatée par l'enrobage dans les huiles végétales, nous nous sommes demandé si, en ajoutant à ces substances un élément irrésorbable tel que la lanoline, on ne parviendrait pas encore à renforcer les réactions allergiques. Dans ce but, nous avons incorporé les bacilles morts au mélange préconisé par Ramon — une partie de lanoline pour deux parties d'huile d'olive — dans ses recherches d'enrobage des anatoxines et antitoxines diphtériques et tétaniques.

A 10 grammes de lanoline préalablement stérilisée, nous avons incorporé 10 centigrammes de corps microbiens, puis en agitant vigoureusement, nous avons ajouté lentement 20 cent. cubes d'huile d'olive. En procédant ainsi, on obtient une émulsion parfaite et inoculable qui fut injectée, à un lot de cobayes à raison de 1 centigramme de bacilles morts enrobés dans 3 cent. cubes du mélange huile-lanoline par animal.

Un autre lot fut inoculé dans les mêmes conditions, mais l'huile d'olive avait été remplacée par l'eau physiologique. Etant donné la difficulté d'incorporer l'eau à la lanoline, il fut nécessaire de mettre le mélange au bain-marie à 50° pendant une demi-heure et d'effectuer les inoculations avec une seringue portée à la même température.

Ces deux lots d'animaux réagirent faiblement de façon sensiblement identique du vingt-et-unième jour au cinquième mois qui suivit l'inoculation. Mais à partir du sixième mois, on constata une augmentation tardive de l'allergie chez les seuls animaux ayant reçu de la lanoline additionnée d'eau.

Dans l'ensemble, ces constatations montrent que les bacilles morts, inoculés au cobaye, se comportent de façon différente suivant qu'ils sont enrobés dans des excipients gras d'origine végétale, animale ou minérale.

Le jaune d'œuf n'a aucune influence sur le pouvoir allergique des bacilles morts ; seules, les huiles végétales et la lanoline déterminent un accroissement des réactions tuberculiniques dont l'intensité est beaucoup moins prononcée qu'avec les substances grasses d'origine minérale, c'est-à-dire l'huile de vaseline et la paraffine.

**Surinfection des cobayes préparés
avec des bacilles tuberculeux morts enrobés
dans l'huile de vaseline.**

Nous avons démontré que l'enrobage des bacilles morts dans l'huile de vaseline s'accompagne d'une augmentation considérable du pouvoir allergique ; or, les expériences d'Allen Krause [24] et H. S. Willis [25] et celles de A. Boquet et ses collaborateurs [26], ont mis en lumière que, chez les cobayes allergiques, les bacilles de surinfection subissent un retard dans leur dispersion d'autant plus considérable que la résistance conférée par les germes de primo-infection est plus forte.

Il s'imposait donc de rechercher en suivant la progression de l'infection par ensemencement de fragments d'organes, chez des cobayes rendus fortement allergiques par des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline, si cet accroissement de l'allergie s'accompagne d'un ralentissement de dissémination des germes virulents.

SURINFECTION PAR VOIE SOUS-CUTANÉE OU INTRAMUSCULAIRE. — Des cobayes sont préparés, par voie sous-cutanée, avec 1 centigramme de bacilles morts, souche bovine Vallée, enrobés dans 1 cent. cube d'huile de vaseline. Au bout de cinquante-huit jours, on choisit tous ceux ayant réagi nécrotiquement à la tuberculine suivant une réaction d'intensité égale à celle d'un phénomène de Koch [27].

Ces animaux sont divisés en deux lots égaux et éprouvés, ainsi qu'un même nombre de cobayes neufs témoins, avec 1/10.000 de milligramme soit de la souche bovine Vallée, soit de la souche humaine Car... ; cette dernière récemment isolée provient d'une tuberculose rénale et elle possède une virulence normale (mort du cobaye par tuberculose généralisée en cinq à six mois à la dose de 1/100.000 à 1/1.000.000 de milligramme par voie sous-cutanée). L'inoculation d'épreuve est effectuée par voie sous-cutanée, dans la cuisse opposée à celle où a eu lieu l'injection de bacilles morts dans l'huile.

D'un autre côté, des cobayes furent préparés avec les mêmes corps microbiens mais simplement suspendus dans l'eau physiologique ; ils furent ensuite surinfectés après quarante-huit jours, alors que l'allergie assez instable et irrégulière n'était représentée que par une faible papule, dans les mêmes conditions que précédemment.

Pour suivre la dispersion des germes d'épreuve, à différents intervalles des animaux surinfectés et des témoins ont été sacrifiés ; chaque fois, nous avons prélevé les ganglions inguinaux et lombaires corres-

pendant au lieu de l'inoculation virulente, ainsi qu'un fragment de rate et de poumon (la taille de ce fragment était d'environ la moitié de la rate normale).

Ces produits furent ensuite broyés séparément, traités par la technique à l'acide sulfurique et neutralisation à la soude [28], puisensemencés à la surface de 4 à 6 tubes de milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite.

Dès l'apparition de lésions macroscopiques dans les organes, on s'abstenait de les ensemençer.

Chez les animaux préparés avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline, les lésions n'apparurent dans la rate qu'entre quarante et quarante-cinq jours tandis que les témoins en ont présentées dès le vingt-sixième jour.

Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant :

Dispersion des germes de surinfection inoculés par voie sous-cutanée chez des cobayes préparés avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline ou émulsionnés dans l'eau physiologique.

JOURS	PRÉPARÉS AVEC DES BACILLES morts dans l'huile		PRÉPARÉS AVEC DES BACILLES morts dans l'eau	
	Ganglion	Rate	Ganglion	Rate
2	0			B. V.
3		8 colonies.	0	H. C.
5	0	0		B. V.
6	0	0		H. C.
7			0	B. V.
			40 colonies.	0
9	10 colonies.	0		H. C.
	50 colonies.	0		B. V.
11	2 colonies	7 colonies.	Quelques colonies.	H. C.
12	Innombrables.	0	Colonies nombreuses.	0
13				10 colonies.
14	Innombrables.	0	Innombrables.	H. C.
15				240 colonies.
16	Quelques colonies.	0	Innombrables.	B. V.
18	Innombrables.	0		H. C.
20				200 colonies.
25	Innombrables.	0	Innombrables.	H. C.
26		0		B. V.
				Innombrables.

B. V., bovine Vallée; H. C., humaine Car...

JOURS	ANIMAUX TÉMOINS	
	Ganglion	Rate
2.	0	B. V.
3.	3 colonies.	H. C.
5.	5 colonies.	B. V.
6.	0	H. C.
7.	Colonies innombrables.	4 colonies. B. V.
9.	4 colonies.	0 H. C.
11.	Colonies innombrables.	80 colonies. B. V.
12.	Colonies innombrables.	120 colonies. H. C.
14.	Colonies abondantes.	28 colonies. B. V.
16.	Colonies innombrables.	Colonies innombrables. H. C.
18.	Colonies innombrables.	Colonies innombrables. B. V.
25.	Colonies innombrables.	Abondantes colonies. H. C.
26.	Colonies innombrables	Colonies innombrables. B. V.

SURINFECTION PAR VOIE INTRADERMIQUE. — Des cobayes préparés avec des corps microbiens de la souche bovine Vallée, enrobés dans l'huile de vaseline, par voie intramusculaire et qui réagissaient le cinquante-et-unième jour aussi fortement à la tuberculine [29] que les animaux du groupe précédent, sont divisés en deux lots égaux.

Le premier, ainsi qu'un même nombre de cobayes neufs témoins, reçoivent dans la partie inférieure du flanc gauche, par voie intradermique, 1/10.000 de milligramme de la souche humaine Car..., culture sur pomme de terre glycélinée, âgée de vingt-quatre jours.

Le deuxième lot de cobayes préparés ainsi qu'un nombre égal d'animaux témoins sont inoculés de façon identique mais avec la souche bovine virulente Vallée, culture sur pomme de terre glycélinée, âgée de vingt-six jours.

Indépendamment de la souche employée, l'inoculation dermique des bacilles virulents fut suivie, chez tous les animaux préparés à quelques exceptions près, entre vingt-quatre et quarante-huit heures, de l'apparition d'une petite papule rosée cedémateuse, de quelques millimètres de diamètre, analogue à une réaction allergique. Au cinquième ou au sixième jour, cette papule s'est transformée en un petit nodule franchement nécrosé du volume d'une lentille ; dans le même temps, les cobayes témoins ne présentent aucune trace de l'inoculation virulente. Au quinzième jour, les différences se sont encore accentuées ; chez la plupart des animaux surinfectés, la lésion locale diminue de plus en plus et se réduit à un petit nodule de la taille d'une tête d'épingle, recouvert d'une croûte ou eschare, qui, lorsqu'elle tombe, laisse voir un petit cratère ; cet aspect se conserve jusqu'à la fin de la maladie. Au con-

traire, chez les témoins, l'apparition d'un nodule ne se fait que vers le huitième ou dixième jour, mais il s'ulcère entre le quinzième et le dix-huitième jour pour laisser place dans la suite, entre vingt-quatre et vingt-sept jours, à un chancre.

Autrement dit, ces réactions d'hypersensibilité ont présenté les mêmes caractères et le même degré d'intensité que ceux décrits par Allen Krause et Peters, et par A. Boquet, chez des animaux préparés avec des bacilles vivants et virulents.

Mais pour en revenir à notre expérience, on sacrifie simultanément deux cobayes, un préparé et un témoin, à des intervalles de temps variables, c'est-à-dire au bout de six, dix, seize, vingt-et-un, vingt-huit et trente-quatre jours pour le groupe d'animaux infectés avec la souche humaine, et après neuf, treize, dix-huit, vingt-cinq, trente-et-un et trente-neuf jours pour le lot d'animaux ayant reçu la souche bovine.

Comme dans l'expérience précédente, on a prélevé les ganglions et des fragments de rate et de poumons qui furentensemencés.

Les lésions viscérales furent constatées entre quarante et quarante-cinq jours chez les témoins et entre soixante et soixante-cinq jours chez les animaux préparés, moment auquel on cessa les ensemencements.

Le tableau suivant consigne les résultats obtenus :

Dispersion des germes de surinfection, inoculés par voie intradermique chez des cobayes préparés avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline.

JOURS	ANIMAUX PRÉPARÉS			
	Ganglions	Rate	Poumons	
6	0	0		H. C.
9	40 colonies.	0		B. V.
10	Colonies nombreuses.	0		H. C.
13	Colonies innombrables.	0		B. V.
16	60 colonies.	0		H. C.
18	Colonies innombrables.	0		B. V.
21	Colonies innombrables.	0		H. C.
25	Colonies innombrables.	4 colonies.		B. V.
28		0	0	H. C.
31		0	0	B. V.
34		0	0	H. C.
39		0	0	B. V.

JOURS	ANIMAUX TÉMOINS		
	Ganglions	Rate	Poumons
6	32 colonies.	0	H. C.
9	Colonies innombrables.	0	B. V.
10	Colonies innombrables.	0	H. C.
13	0	12 colonies.	B. V.
16	Colonies innombrables.	0	H. C.
18	Colonies innombrables.	120 colonies.	0 B. V.
21	Colonies innombrables.	0	H. C.
25		120 colonies.	4 colonies. B. V.
28		Colonies innombrables.	0 H. C.
31		Colonies innombrables.	0 B. V.
34		Colonies nombreuses.	0 H. C.
39		Colonies nombreuses.	5 colonies. B. V.

Il ressort des tableaux rapportant les observations des deux dernières expériences que chez les animaux, surinfectés par voie sous-cutanée ou intradermique, on constate très nettement un ralentissement de la dispersion des germes d'épreuve par comparaison avec les animaux témoins.

Chez ces derniers, les bacilles virulents gagnent les ganglions de voisinage entre le cinquième et le sixième jour. La bacillémie initiale qui aboutit à la contamination de la rate se produit au douzième jour (voie sous-cutanée) ou au dix-huitième jour (voie intradermique).

En ce qui concerne les cobayes préparés avec des corps microbiens émulsionnés dans l'eau physiologique, les bacilles de surinfection parviennent aux ganglions satellites dans le même délai que chez les témoins mais en moins grande quantité, surtout au début de l'invasion bacillaire. Par culture de la rate, on a pu constater un léger retard dans le déversement des germes virulents dans le courant sanguin, fait qui concorde dans l'ensemble à celui observé en Amérique par Freund [30], les légères divergences constatées pouvant s'expliquer par les différentes méthodes mises en œuvre.

Ces résultats contrastent avec ceux obtenus chez les animaux préparés avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline. Dans ce cas, les germes de surinfection, injectés par voie sous-cutanée ou intradermique, restent au lieu de l'incubation en moyenne jusqu'au septième ou neuvième jour. A

cé moment, ils commencent à envahir les ganglions satellites et leur nombre augmente rapidement dans la suite.

La différence avec les témoins s'accuse beaucoup plus encore lorsqu'on examine les délais nécessaires à la contamination de la rate. Alors qu'ils sont déjà présents entre le onzième et le quinzième jour chez les témoins, les bacilles d'épreuve n'atteignent cet organe qu'au vingt-sixième jour chez les cobayes éprouvés par voie sous-cutanée ou n'y sont pas encore présents le trente et unième jour chez ceux surinfectés par voie intradermique.

Ce retard variable apporté dans la dispersion provient uniquement de la voie d'inoculation empruntée. On peut en effet le démontrer par le fait que chez les témoins infectés par voie sous-cutanée, les bacilles apparaissent dans la rate dès le vingt et unième jour, tandis qu'on ne les trouve régulièrement dans cet organe, chez les témoins inoculés par voie intradermique, qu'après le vingt-cinquième jour.

Les résultats ont toujours été sensiblement les mêmes avec les deux souches humaine ou bovine employées pour la surinfection.

Ces expériences démontrent que l'augmentation du pouvoir allergique produite par l'enrobage dans l'huile de vaseline, s'accompagne d'un retard dans le transit des bacilles de surinfection du point d'inoculation aux ganglions et aux viscères annexes. Ce retard, plus marqué quand on emprunte pour la surinfection la voie intradermique, est beaucoup plus sensible que celui qui s'observe avec des bacilles morts simplement émulsionnés dans l'eau physiologique.

Vaccination du cobaye avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline.

Le ralentissement de la dispersion des germes de surinfection étant démontré chez des cobayes préparés avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline, il reste à voir si ce retard est l'expression d'un pouvoir vaccinant efficace contre la tuberculose [32].

Mais avant de répondre à cette question, il nous faut recher-

cher la résistance conférée aux cobayes par des bacilles morts en suspension dans l'eau physiologique ; ces résultats nous serviront de test de comparaison dans l'expérience que nous allons entreprendre.

ANIMAUX PRÉPARÉS AVEC DES BACILLES BOVINS MORTS ÉMULSIONNÉS DANS L'EAU. — Deux lots de 7 cobayes reçoivent par voie sous-cutanée, 10 milligrammes de corps microbiens, souche bovine Vallée, émulsionnés en eau physiologique. Au bout de cinq semaines, l'état allergique se manifeste par une simple papule. On surinfecte à ce moment les animaux ainsi que 10 cobayes témoins avec 1/10.000 de milligramme de la souche bovine Vallée, culture sur pomme de terre glycinée, âgée de vingt-six jours, dans le muscle de la patte opposée à l'inoculation de bacilles morts.

Quatre des animaux préparés, sacrifiés entre soixante et soixante-quinze jours n'accusent aucune différence nette avec les témoins. Ces derniers, ainsi que la plupart des animaux vaccinés, meurent de tuberculose généralisée entre trois et cinq mois. Seuls, deux cobayes ayant reçu préalablement des bacilles morts ont survécu deux mois et deux mois et demi aux témoins.

En résumé, cette expérience ne fait que confirmer les faits déjà bien connus d'après lesquels le pouvoir immunisant des bacilles morts est médiocre.

ANIMAUX PRÉPARÉS AVEC DES BACILLES BOVINS MORTS EN SUSPENSION DANS L'HUILE DE VASELINE. SURINFECTION PAR VOIE SOUS-CUTANÉE. — Dans des lots de cobayes qui avaient été préparés simultanément avec les mêmes germes mais enrobés dans l'huile de vaseline, on choisit, quarante à quarante-cinq jours après l'inoculation, tous ceux dont l'état allergique se traduisait par une belle cocarde de 25 à 30 millimètres de diamètre. On les surinfecte avec 1/10.000 de milligramme de la souche bovine Vallée, par voie sous-cutanée.

8 de ces cobayes, sacrifiés entre le sixième et le sixante-quinzième jour, ne montrent que des lésions ganglionnaires, différence nette d'avec les témoins qui ont déjà les viscères atteints.

Deux autres animaux préparés, sacrifiés après le troisième mois, ont de plus quelques granulations sur la rate. Il est à noter qu'au bout de cinq mois, tous les témoins sont morts de tuberculose généralisée. Or, entre six et huit mois, meurent de maladie intercurrente les trois derniers cobayes surinfectés.

Ils avaient tous un foie et une rate d'apparence normale et deux d'entre eux présentaient des granulations sur les poumons.

SURINFECTION PAR VOIE INTRADERMIQUE. — Grandes doses. — 40 cobayes sont préparés comme précédemment avec des bacilles morts, enrobés dans l'huile de vaseline, et injectés dans la cuisse gauche.

Après six semaines, ils sont surinfectés ainsi qu'un même nombre de cobayes témoins, dans le derme du flanc droit avec 1/10 ou 1/100 de milligramme de la souche bovine Vallée, culture âgée de vingt-deux jours.

Chez tous les animaux préparés, les lésions restent ganglionnaires jusqu'au troisième mois. Les premières granulations sur la rate ne se voient qu'après cent-quatorze jours, contraste frappant avec les témoins qui, dès le soixantième jour, montrent des lésions de tuberculose généralisée. Mais tous ces animaux meurent entre cinq et six mois et on ne peut enregistrer aucune survie de ceux préparés avec les bacilles morts enrobés dans l'huile.

Faibles doses. — On entreprend alors une autre série d'expériences comprenant 20 cobayes préparés comme précédemment mais infectés avec des doses minimales de la même souche virulente, 1/10.000 ou 1/100.000 de milligramme.

Chez les témoins, les ganglions inguinaux, axillaires et lombaires correspondants sont pris dès le soixantième jour, la rate dès le soixante-dix-septième ; enfin au cent-trentième jour, tous les viscères sont contaminés. Ces cobayes commencent à mourir de tuberculose généralisée à partir du sixième mois.

Si on compare ces résultats avec ceux obtenus chez les cobayes préparés avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline, on constate que l'extension des lésions est bien moins rapide dans le dernier cas ; les ganglions axillaires ou inguinaux sont atteints vers le soixante-dixième jour. La généralisation de la maladie ne s'observe qu'à partir du cent quatre-vingt-septième jour, encore faut-il noter leur peu d'étendue, rares nodules sur la rate, foie et poumons apparemment sains chez tous les cobayes, sauf un.

Les faits concernant le pouvoir vaccinant des bacilles morts

enrobés dans l'huile de vaseline peuvent être résumés comme suit :

L'inoculation sous-cutanée, confère au cobaye une résistance qui a pour effet de retarder l'apparition et la généralisation des lésions de surinfection. Ceci par comparaison avec les résultats donnés par des bacilles morts simplement mis en suspension dans l'eau physiologique.

Cette résistance est d'autant plus évidente qu'on emploie pour la surinfection des doses plus faibles d'une souche de moyenne virulence, par voie sous-cutanée.

Cependant nos résultats sont moins nets que ceux obtenus par Coulaud [34], dans ses recherches de vaccination contre la tuberculose par des bacilles morts enrobés dans la paraffine. En effet, les cobayes préparés par cet auteur et éprouvés par voie sous-cutanée, avec 1/1.000 de milligramme de la même souche bovine Vallée que nous avons utilisée, étaient encore tous vivants, neuf mois après cette surinfection massive, alors que tous les témoins étaient morts de tuberculose généralisée au bout de cent-soixante jours.

Quand on emprunte la voie intradermique et l'inoculation d'épreuve de 1/10 à 1/100 de milligramme, la résistance ne se révèle que par le retard de l'invasion viscérale. La survie est la même chez les vaccinés et chez les témoins.

Ce n'est que par l'emploi de doses minimales, 1/10.000 à 1/100.000 de milligramme, qu'on observe un pouvoir vaccinant marqué des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline.

Dans l'ensemble, ces essais montrent que l'enrobage dans l'huile de vaseline des bacilles morts se traduit par un retard appréciable de la dispersion des germes de surinfection, qui ne suffit pas pour conférer au cobaye une vaccination totale, même si on emploie des doses minimales d'une souche de virulence moyenne.

Or, l'augmentation considérable du pouvoir allergique ne s'accompagne pas, dans nos expériences, d'une progression parallèle de l'immunité. Contrairement aux résultats obtenus tout récemment par Coulaud [35] avec la paraffine, nous n'avons pas réussi, avec l'huile de vaseline, à protéger le cobaye d'une façon totale contre la tuberculose.

Chez 20 cobayes divisés en quatre séries, préparés avec la paraffine et réinoculés trente jours plus tard dans le péritoine avec $1/25$ à $1/100$ de milligramme de souches de bacilles tuberculeux virulents d'origine humaine ou bovine, Coulaud avait en effet pu constater, en les sacrifiant quinze à deux cent trente-six jours après l'inoculation virulente, qu'ils ne présentaient aucune lésion tuberculeuse. Des coupes histologiques, effectuées deux cent quatre jours après l'inoculation, n'avaient montré aucun follicule tuberculeux au niveau des viscères.

Tels sont les faits importants apportés par Coulaud qui affirme avoir obtenu une vaccination réelle complète du cobaye contre la tuberculose.

En nous plaçant exactement dans les mêmes conditions, mais en utilisant des doses d'épreuve cent et mille fois plus faibles d'une souche humaine de moyenne virulence, nous avons répété les expériences de Coulaud, mais les résultats obtenus ont été tout différents. Voici ce que nous avons constaté :

Des animaux, préparés par voie sous-cutanée, avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline et réagissant nécrotiquement à la tuberculine, sont infectés, trente jours après par voie péritonéale, avec $1/10.000$ de milligramme de la souche Car...

Un nombre égal de cobayes neufs témoins sont inoculés simultanément, dans les mêmes conditions.

Deux cobayes préparés, sacrifiés le quarante-deuxième et le soixante-huitième jour après l'inoculation virulente présentaient déjà, principalement dans la rate et les poumons, des nodules tuberculeux moins nombreux d'ailleurs que chez les témoins.

Trois animaux, sacrifiés trois mois après l'infection d'épreuve se différenciaient des témoins porteurs d'une tuberculose généralisée par la présence de lésions ganglionnaires seulement fibreuses et de granulations plus discrètes sur la rate et les poumons.

Dans ce lot, deux cobayes préparés et éprouvés furent trouvés à cette date indemnes. Le même résultat déconcertant fut observé chez un cobaye du groupe témoin. Ces trois défaillances ont pu être expliquées par le fait qu'on n'est jamais

certain d'inoculer dans le péritoine. Maurice Nicolle a, maintes fois, signalé cette cause d'erreur en nous mettant en garde contre l'injection du produit dans le tube digestif. D'un autre côté, E. Rist, Léon-Kindberg et J. Rolland [33], dans un travail sur la réinfection tuberculeuse, ont cité plusieurs exemples où l'injection soi-disant péritonéale avait été poussée dans l'intestin.

Quatre cobayes de la deuxième série, ayant reçu 1/100.000 de germes d'épreuve, sacrifiés le cinquième mois, furent trouvés porteurs d'une tuberculose généralisée.

Essais d'interprétation du mécanisme de l'action de l'huile de vaseline sur les germes sensibilisants.

Vallée a été le premier auteur à émettre l'hypothèse que l'huile de vaseline agirait sur les bacilles en tant « qu'excipient irrésorbable ». Autrement dit, l'huile de vaseline, par sa consistance et sa densité, fixerait les bacilles à l'endroit de l'inoculation, ce qui aurait pour conséquence, une résorption et une dispersion beaucoup plus lentes de l'antigène dans l'organisme des animaux ainsi traités.

En vue d'élucider le mécanisme d'action de l'huile, nous avons effectué les expériences [36] que voici :

I. 12 cobayes, inoculés depuis cinq semaines avec une souche d'origine bovine F 2 bis, et présentant des lésions de tuberculose généralisée, sont divisés en trois groupes.

Une premier lot de 4 cobayes reçoit par voie sous-cutanée, enrobés dans le mélange d'huile et de lanoline, d'après la formule préconisée par Ramon, 0 gr. 50, 0 gr. 80 ou 1 gramme de tuberculine brute (4 cent. cubes du mélange contiennent 1 gramme de tuberculine).

Un deuxième lot reçoit 0 gr. 50, 0 gr. 80 ou 1 gramme de tuberculine brute, dans les mêmes conditions, mais enrobés dans l'huile de vaseline.

Enfin, dans le troisième lot, la tuberculine inoculée aux animaux, aux doses de 0 gr. 50, 0 gr. 80, 1 gramme ou 1 gr. 50, est simplement diluée en eau physiologique, toujours dans les mêmes proportions.

Tous ces animaux, quels que soient les excipients auxquels la tuberculine fut incorporée, sont morts après cinq à huit heures, avec les symptômes classiques d'intoxication tuberculinique.

II. 28 cobayes, pesant environ 400 grammes et de pelage blanc, sont divisés en deux lots égaux.

Le premier reçoit par voie sous-cutanée 1/10.000 de milligramme de la souche bovine Vallée, dilué dans 1 cent. cube d'eau physiologique. L'autre est inoculé de la même façon, mais les bacilles sont enrobés dans 1 cent. cube d'huile de vaseline.

L'allergie, recherchée à différents intervalles, a apparu dans les délais suivants : cinq jours, nulle ; neuf jours, nulle chez les animaux inoculés avec l'huile, commencement de réaction chez 2 des 14 témoins ; quinze jours, papule nette chez tous les animaux inoculés avec ou sans huile ; vingt-six jours, réaction nécrotique de même intensité chez tous les cobayes.

A quelques exceptions près, le commencement et la progression de l'allergie se sont révélés sensiblement identiques, que les bacilles aient été ou non enrobés dans l'huile de vaseline.

Des cobayes des deux lots ont été sacrifiés en vue d'étudier la dispersion des germes dans l'organisme des animaux, par la technique que nous avons indiquée plus haut.

A différents intervalles, entre le cinquième et le vingt et unième jour, on sacrifie simultanément deux animaux ayant reçu les bacilles, l'un dans l'huile et l'autre dans l'eau.

On prélève les ganglions satellites et la rate qu'on examine séparément sur 3 tubes de milieu de Loewenstein, après traitement par l'acide sulfurique.

Dès le cinquième jour, mais régulièrement à partir du neuvième, les bacilles sont présents dans les ganglions inguinaux et lombaires, quelles que soient les conditions de l'inoculation ; au treizième jour, on les décèle dans la rate, en nombre plus restreint chez les cobayes inoculés avec l'huile que chez les témoins. A partir du dix-neuvième jour, les colonies sont innombrables dans les deux groupes d'animaux étudiés.

En résumé, que les bacilles soient émulsionnés dans l'eau ou dans l'huile de vaseline, ils gagnent les ganglions correspondants et se dispersent dans les organes profonds avec la même rapidité.

III. D'une culture d'origine humaine Car..., âgée de dix-neuf jours, 10 centigrammes sont émulsionnés dans 1 cent. cube d'eau physiologique. Cette émulsion-mère est divisée en deux parties égales et sert

à effectuer des dilutions soit en huile de vaseline, soit en eau physiologique jusqu'à 1/10.000 de milligramme par centimètre cube. On inocule ensuite 7 cobayes avec chacune des émulsions de ce dernier taux, dans le muscle de la cuisse.

Les manifestations de l'allergie, tant au point de vue de la rapidité d'apparition qu'au point de vue de l'intensité, furent identiques à celles du groupe précédent.

De même, l'ensemencement des organes permit de constater une bacillémie initiale, révélée par la contamination de la rate seize jours après l'inoculation dans les deux lots d'animaux.

IV. On répète l'expérience précédente, mais on infecte les animaux avec 1/100.000 de milligramme.

Les cobayes éprouvés à l'intradermo-réaction tuberculinique, réagissaient, après douze jours, 4 sur 7 dans le groupe inoculé avec l'eau, et 2 sur 7 dans le groupe inoculé avec l'huile. Au bout de dix-sept jours, tous les animaux montrent une papule à centre nécrotique.

L'ensemencement des organes, effectué comme précédemment, a montré, après huit jours, que les bacilles avaient envahi plus abondamment les ganglions satellites des cobayes inoculés avec des bacilles émulsionnés dans l'eau. De même, après dix-huit jours, la rate des animaux ayant reçu l'émulsion dans l'huile fournit quelques colonies tandis que, dans l'autre lot, le même ensemencement donne d'innombrables colonies. Au vingtième jour, l'infection de cet organe se révèle d'égale intensité dans les deux cas. Enfin, le vingt-sixième jour, la culture du poumon est négative chez les cobayes infectés avec l'émulsion dans l'huile, alors qu'on obtient 6 colonies chez les témoins.

En résumé, dispersion en quelque sorte graduée, mais non retardée, chez les animaux inoculés avec l'huile de vaseline.

En effet, nos expériences montrent tout d'abord que la rapidité de la diffusion de la tuberculine et de l'intoxication tuberculinique ne se trouve pas entravée par l'emploi d'un excipient gras (lanoline ou huile de vaseline), chez les animaux tuberculeux.

De plus, chez les cobayes inoculés avec une dose minime de 1/10.000 de milligramme d'une souche bovine ou humaine, le commencement et la progression de l'allergie, la dispersion des bacilles dans les organes se produisent — à quelques exceptions près — suivant un même degré d'intensité, que les germes soient mis en suspension dans l'eau physiologique ou enrobés dans l'huile de vaseline.

Il faut descendre à des doses plus faibles, 1/100.000 de milligramme pour constater nettement qu'en réalité, il n'y a pas retard de diffusion mais plutôt libération graduée de l'antigène.

Ces faits d'ailleurs confirment ce que nous avons décrit précédemment ; l'augmentation de l'allergie produite par l'enrobage dans l'huile de vaseline des bacilles morts, qui s'accompagne d'un raccourcissement de la période anté-allergique, ne pourrait s'expliquer si l'absorption de l'antigène était retardée.

Ces expériences viennent aussi à l'appui de l'hypothèse émise maintes fois par Ramon [37] d'après laquelle l'huile de vaseline agirait de même que le tapioca dans l'immunité antidiphtérique et antitétanique, la gélose et l'alun dans la vaccination charbonneuse, en tant que substance adjuvante. L'huile de vaseline, en modifiant le terrain au point de l'inoculation, sans augmenter en rien la valeur intrinsèque de l'antigène (Ramon), provoquerait des phénomènes inflammatoires locaux qui favoriseraient l'intervention d'éléments cellulaires et humoraux responsables de l'augmentation de l'allergie et de l'immunité.

Résumé et conclusions.

Il résulte des constatations précédentes que l'enrobage dans l'huile de vaseline des bacilles tuberculeux morts des mammi-fères se traduit, chez le cobaye, par un accroissement considérable du pouvoir allergique qui se manifeste par un raccourcissement de la période anté-allergique et par l'augmentation de l'intensité de la réaction.

La durée de la période anté-allergique a été de cinq jours chez les animaux inoculés par voie intrapulmonaire ou testi-

culaire et plus longue, six à huit jours, chez ceux préparés par voie sous-cutanée ou intramusculaire.

Chez les premiers, la réaction est nécrotique entre le treizième et le quinzième jour, tandis que chez les derniers, elle ne le devient qu'après quinze à vingt jours.

Mais, indépendamment de la voie d'inoculation empruntée, l'allergie continue à augmenter d'intensité en moyenne jusqu'au soixante-dixième jour ; à partir de cette date, elle reste stationnaire, pendant plus d'une année durant laquelle elle ne varie que dans des proportions insignifiantes.

Le degré de l'allergie produite par les bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline est au moins aussi intense que celui provoqué par les bacilles vivants et virulents.

Dans des expériences de surinfection par voie intradermique, chez des animaux ainsi préparés, le phénomène de Koch et les réactions d'hypersensibilité qui caractérisent l'état allergique ont présenté la même intensité que celle constatée chez des cobayes tuberculeux.

Les cobayes ayant reçu des bacilles morts enrobés dans l'huile par voie plantaire, sous-cutanée, intramusculaire ou testiculaire, résistent à l'injection sous-cutanée de 1 gramme de tuberculine brute tandis que ceux infectés par voie pulmonaire succombent par intoxication tuberculinique à l'injection de 30 à 40 centigrammes de la même substance.

L'action de l'enrobage des bacilles aviaires ou paratuberculeux dans l'huile de vaseline se traduit par des phénomènes réactionnels d'ordre général ou local qui confirment les faits observés avec les bacilles des mammifères. Comme on devait s'y attendre, le degré de l'allergie est en rapport avec la qualité de l'antigène employé.

L'huile de vaseline exerce une action non limitée aux bacilles acido-résistants ; cette substance renforce aussi les réactions allergiques produites par d'autres germes sensibilisants tels que les bacilles de la pseudo-tuberculose de Malassez et Vignal, de la morve et de la fièvre de Malte.

Les excipients gras d'origine animale comme la lanoline ou le jaune d'œuf n'ont aucune influence sur le pouvoir allergique des bacilles morts ; seules les huiles végétales d'olive et d'arachide déterminent un accroissement des réactions tuber-

culiniques dont l'intensité est d'ailleurs beaucoup moins prononcée qu'avec les huiles d'origine minérale.

L'augmentation du pouvoir allergique produite par l'enrobage dans l'huile de vaseline s'accompagne d'un retard fort appréciable dans le transit des bacilles de surinfection, du point d'inoculation aux ganglions et aux viscères annexes. Ce retard est plus manifeste si, au lieu de la voie sous-cutanée, on se sert pour la surinfection de la voie intradermique.

Le pouvoir vaccinant des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline a pour effet de retarder l'apparition et la généralisation des lésions de surinfection.

Cette résistance est d'autant plus nette qu'on emploie pour la surinfection des doses plus faibles de souches de bacilles tuberculeux de moyenne virulence.

Toutefois, nos constatations montrent en toute netteté que la résistance conférée est insuffisante pour protéger l'animal d'une façon totale contre la tuberculose.

Nos essais en vue d'élucider le mécanisme d'action de l'huile de vaseline nous ont montré qu'il ne dépend pas d'une résorption retardée de l'antigène. L'augmentation des réactions d'hypersensibilité serait plutôt due à l'intervention d'éléments cellulaires et humoraux qui interviendraient sous l'influence des phénomènes inflammatoires produits par cette substance au lieu de l'inoculation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **91**, 1924, p. 335 ;
Ces Annales, **40**, 1926, p. 11.
- [2] PETROFF et STEWART. *Journ. of Immun.*, **10**, n° 4, août 1925.
- [3] BRANCH et CUFF (J. R.). *Journ. of Infect. Dis.*, **47**, août 1930.
- [4] CRAWFORD. *Journ. Vet. Med. Assoc.*, **64**.
- [5] BOQUET (A.) et BRETEY (J.). *Ces Annales*, **52**, 1934, p. 252.
- [6] COULAUD. *Revue de la Tuberc.*, **2**, 4^e série, p. 850.
- [7] COULAUD. *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 368.
- [8] COULAUD. *Journ. Méd. de Leysin*, n° 1, janvier 1937.
- [9] COULAUD. *Bull. Acad. de Méd.*, **115**, 100^e année, 3^e série, 1936,
n° 5, p. 232.
- [10] LE MOIGNIC et PINOY. *C. R. Soc. de Biol.*, **79**, 1916, p. 201 et 352.
- [11] RAMON (G.). *C. R. Soc. de Biol.*, **117**, 1934, p. 952.
- [12] VALLÉE (H.). *C. R. Acad. des Sciences*, **178**, 1924, p. 152. — *Rev. Gén. de Méd. Vét.*, **33**, 1924, p. 1. — *Bull. mens. de la Soc. Vétér. prat. de France*, juin 1927.

- [13] SAENZ (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **120**, 1935, p. 870.
- [14] SAENZ (A.). *Ibid.*, **120**, 1935, p. 1050.
- [15] SAENZ (A.). *Ibid.*, **121**, 1936, p. 957.
- [16] SHWARTZMAN. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **25**, 1928, p. 560, et **26**, p. 207.
- [17] SANARELLI. *Schw. Med. Woch.*, 65^e année, n° 37, 1935, p. 1.
- [18] SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *Ces Annales*, **55**, 1935, p. 518.
- [19] SAENZ (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **121**, 1936, p. 1561.
- [20] SAENZ (A.). *Ibid.*, **122**, 1936, p. 911.
- [21] SAENZ (A.). *Ibid.*, **122**, 1936, p. 911.
- [22] SARNOWIEC. *Ces Annales*, **53**, 1934, p. 166.
- [23] SAENZ (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **124**, 1937, p. 338.
- [24] KRAUSE (A.). *Amer. Rev. of Tuberc.*, **14**, 1926, p. 211.
- [25] WILLIS (H. S.). *Amer. Rev. of Tuberc.*, **11**, p. 427-439.
- [26] BOQUET (A.). *Ces Annales*, **50**, 1933, p. 5.
- [27] SAENZ (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **124**, 1937, p. 1161.
- [28] SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *Diagnostic bactériologique de la Tuberculose. Monographie de l'Institut Pasteur*, 1936, Masson et C^{ie}, édit.
- [29] SAENZ (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **125**, 1937, p. 98.
- [30] FREUND. *Proc. exp. Biol. and Med.*, **29**, 1931-1932, p. 1200.
- [31] VELU (H.), ZOTTNER (G.) et SARTHOU (C.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 857.
- [32] SAENZ (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **125**, 1937, p. 495.
- [33] RIST (E.), LÉON-KINDBERG et ROLLAND (J.). *Ann. de Méd.*, n° 3, 1914, p. 310.
- [34] COULAUD. *Rev. de la Tuberc.*, **1**, 1935, p. 1883.
- [35] COULAUD. *Bull. de l'Acad. de Méd.*, **117**, 1937, p. 368-370.
- [36] SAENZ (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **125**, 1937, p. 714.
- [37] RAMON (G.). *Revue d'immunologie*, **1**, 1935, p. 199, et **3**, 1937, p. 193 et 202.

LA MALADIE D'AUJESZKY OBSERVÉE CHEZ L'HOMME

par ZEKAI MUAMMER TUNCMAN,

Directeur de l'Institut antirabique d'Istanbul.

Le cas de maladie d'Aujeszky, que nous présentons dans cette note, est le premier observé en Turquie chez l'homme. Il a donné lieu à deux contaminations de laboratoire, ce qui nous a permis d'étudier les caractères biologiques et cliniques de la maladie et d'élucider plusieurs points qui nous paraissent dignes d'intérêt.

Remlinger et Bailly (1) considèrent « le virus d'Aujeszky comme totalement inoffensif pour l'homme ». Pourtant ils citent le travail de von Ratz publié en 1913 et concernant deux cas de contagion chez deux garçons de laboratoire qui s'étaient blessés aux mains au cours d'autopsies. Les deux garçons ont surtout présenté du prurit, puis ils guérirent rapidement. Remlinger et Bailly trouvent ces deux observations « peu convaincantes » au point de vue de la réceptivité de l'homme. Vingt-quatre ans après ces observations de von Ratz, nous venons d'assister dans notre Institut à deux cas de contagion qui confirment l'opinion émise par cet auteur et prouvent que l'homme n'est point réfractaire au virus d'Aujeszky.

OBSERVATION I. — Le préparateur de notre Institut, H..., pendant qu'il dépouille des lapins morts de maladie d'Aujeszky, pour faire ingérer les carcasses à des chiens, à titre d'expérimentation, est blessé à un doigt de la main droite non gantée, par un tranchant d'os. Deux ou trois heures plus tard, un prurit intense apparaît à l'extrémité du doigt blessé, gagne le bras correspondant et le cou, puis s'étend à tout le corps. Les démangeaisons ont été très fortes et les deux mains ne suffisant pas au grattage, le malade se frotte le dos contre le mur. Cet état dure pendant six heures et finit par se calmer après un badiégnage avec un yogourt aigre et un bain.

Le lendemain il ne restait plus qu'une faiblesse générale.

(1) REMLINGER et BAILLY. La paralysie bulbaire infectieuse (Maladie d'Aujeszky). *Biologie médicale*, n° 10, 1933.

Obs. II. — Quelques jours après ce précédent, notre laborantine M^{lle} N., nettoie une boîte de Petri, ayant contenu les viscères d'animaux morts à la suite d'inoculation du virus d'Aujeszky ; le soir, elle ressent un peu de malaise et de courbature, et le lendemain, c'est-à-dire dix-huit heures plus tard, le prurit commence dans la main, puis dans le bras droit, gagne l'épaule et la région scapulaire du même côté, entraîne des grattages internes et incessants et le malade frotte son dos contre un plan dur.

Sur les conseils du D^r H. Behçet, professeur de clinique dermatologique à la Faculté de médecine, on pratique des injections de calcium



FIG. 1.

et d'adrénaline, des lotions d'eau vinaigrée et des bains ; le prurit se calme après quarante-huit heures.

Il reste de la céphalée, de la faiblesse dans les jambes, des taches purpuriques comme reliquats des grattages, une légère éruption urticarienne des pieds, une éruption aphteuse de la muqueuse gingivolabiale et de la douleur dans les deux genoux. Un traitement à l'aspirine et à l'urotropine amène la guérison de ces troubles.

Toute la maladie a ainsi duré trois jours ; l'éruption aphteuse s'est prolongée trois à quatre jours de plus. L'examen des doigts a montré la présence de fines gerçures autour des ongles.

Les recherches de laboratoire, pratiquées chez N..., nous ont donné des résultats intéressants :

Les urines contiennent une trace d'albumine, réduisent légèrement la liqueur de Fehling, sans que la glucosurie puisse être dosable.

Le sérum du sang prélevé dans la veine au moment de la plus forte intensité du prurit a été inoculé dans le cerveau d'un lapin et dans le tissu cellulaire sous-cutané d'un autre. Examinés après dix-huit heures, les deux animaux présentaient tous les signes de la maladie d'Aujeszy, avec épilation chez les deux, surtout chez le lapin inoculé sous la peau, dans une zone de 5×15 centimètres autour du point d'inoculation (fig. 1). Les deux lapins sont morts. Le sang du deuxième lapin a été inoculé dans le cerveau d'un autre lapin et celui-ci a été trouvé « empaillé » le lendemain.

L'examen chimique du sang a donné :

Glucose, en milligrammes p. 100	120
Cholestérine, en milligrammes p. 100.	240
Biliburine, en milligrammes p. 100.	0,3
Reserve alcaline, p. 100.	46,2

Formule leucocytaire :

Polynucléaires neutrophiles	60 p. 100
Polynucléaires éosinophiles	7 —
Mononucléaires	4 —
Lymphocytes.	29 —

Numération des globules :

Globules rouges.	5.000.000 par millimètre cube.
Globules blancs	5 625 —

Vitesse de sédimentation :

1/2 heure	2 millimètres.
1 heure.	9 —
2 heures	29 —
24 heures	65 —
Anneau leucocytaire	1 —

Nos recherches ont donc démontré la présence du virus dans le sang de M^{lle} N..., chez laquelle l'hypercholestérolémie et l'éosinophilie étaient particulièrement marquées.

Huit jours après cet accident, on a prélevé de nouveau chez cette malade du sang qui fut inoculé à des lapins par voie intracérébrale, intraveineuse, sous-cutanée. Tous sont demeurés vivants et bien portants.

Cette expérience montre que, après la guérison, le virus d'Aujeszký ne se trouve plus dans le sang.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Le premier cas de maladie d'Aujeszký chez l'homme a été observé en Turquie (Istanbul). L'homme est donc sensible au virus de cette affection.

2° Chez l'homme atteint de maladie d'Aujeszký on trouve du virus dans le sang, une augmentation du cholestérol sanguin comme dans la rage vraie. La maladie guérit spontanément.

3° Après la guérison, le virus d'Aujeszký ne peut être décelé dans le sang.

ENTÉROCOQUES MOBILES

par SERGE LEVENSON.

(*Institut Pasteur, laboratoire de M. Weinberg.*)

Ellis, dans un mémoire paru en 1902, prétendait que, par des repiquages fréquents, on pouvait rendre mobiles et ciliées *toutes* les *Coccaceae* [8]. D'après lui, ces repiquages répétés, auxquels il procédait dès l'apparition d'une colonie visible, débarrasseraient les cocci du mucus, et c'est alors qu'on pourrait constater la mobilité et la présence de cils chez ces microbes. Il a examiné, par ce procédé, 16 espèces de sarcines, 3 espèces de *Micrococcus* et 3 espèces de *Streptococcus* (*Str. tyrogenes* Henrici 1894, *Str. pallidus* Henrici 1894 et *Str. pyogenes* Rosenbach 1884).

Notons en passant qu'une année plus tard Ellis prétendait qu'il en était de même pour *toutes* les Bactériacées [9].

Bien des chercheurs ont tenté de reproduire les expériences d'Ellis (Fried [11], Burckhardt [6], etc.). Cependant, personne n'a jamais pu confirmer ses observations. Si, parfois, on ne trouve qu'un certain scepticisme ou des doutes vis-à-vis des conceptions d'Ellis (par exemple chez Benecke [2], Omeliansky [23]), c'est surtout Zettnov qui a soumis les recherches d'Ellis à une critique très sévère [31]. La description des mouvements donnée par Ellis a conduit Zettnow à la conclusion qu'il ne s'agissait pas d'une vraie mobilité. D'autre part, d'après cet auteur qui a pratiqué des mensurations sur les planches dessinées d'Ellis, les prétendus cils seraient souvent deux fois plus longs que les cils observés jusqu'alors. Les filaments décrits par Ellis comme cils ne seraient, d'après Zettnow, que des filaments de mucus entourant les corps microbiens (« Schleimgeisseln »). Les contractions de ces filaments muqueux auraient induit Ellis en erreur.

Rappelons à ce propos que Galli-Valerio [42], en 1908, a isolé, d'un cas de pemphigus à répétition, une sarcine absolu-

ment *immobile* qu'il a identifiée comme *Sarcina loewenbergi* Macé et qui, colorée à la fuchsine phéniquée, présentait un réticulum de filaments de mucus que l'on pouvait très facilement confondre avec de vrais cils.

Notons encore une observation intéressante de Zettnow : une culture de *Micrococcus citreus agilis*, ensemencée sur gélose (« Spirillenagar »), bouchée au coton et complètement desséchée, s'est montrée, onze ans plus tard, encore très mobile dès le premier repiquage.

Stölting (1933) fait également une observation intéressante [26] : en étudiant 12 souches mobiles de *Str. bovis* (nous reviendrons plus loin sur les recherches de cet auteur), il constate qu'une « période de repos » paraît favoriser la manifestation de la mobilité. Par contre, la mobilité de ses souches diminuait lorsqu'il faisait des repiquages fréquents. C'est juste le contraire de ce qu'affirmait Ellis.

Nous-même, en étudiant 44 souches d'entérocoques, dont 41 immobiles et 3 mobiles, n'avons jamais observé les phénomènes signalés par Ellis : après des repiquages nombreux et fréquents les souches immobiles sont restées immobiles.

Les affirmations et les généralisations d'Ellis sont donc loin d'être confirmées. Cependant, il n'en est pas moins vrai qu'il existe des *Coccaceae* mobiles et ciliées et qu'on en connaît même déjà depuis longtemps. Migula, dans son « System der Bakterien » (1900), décrit environ 250 espèces de *Coccaceae*, dont 10 mobiles et ciliées [22]. Bergey [3] mentionne dans la dernière édition (1934) de son « Manual of Determinative Bacteriology », 5 espèces mobiles de *Coccaceae*. Mais il s'agit ici toujours de *Micrococcus* ou de sarcines mobiles (d'après la terminologie de Migula : *Planococcus* et *Planosarcina*). Nous reproduisons ici, à titre documentaire, une de nos préparations d'une sarcine ciliée : *Sarcina (Planosarcina) ureae* Beijerinck (fig. 4).

Par contre, les Streptococcées ont été généralement considérées, jusqu'à ces derniers temps, comme absolument immobiles.

STREPTOCOCCÉES MOBILES.

HISTORIQUE. — Th. Billroth (1874) paraît avoir été le premier à observer des streptocoques mobiles [4]. D'après cet auteur on rencontrerait assez fréquemment « des courtes

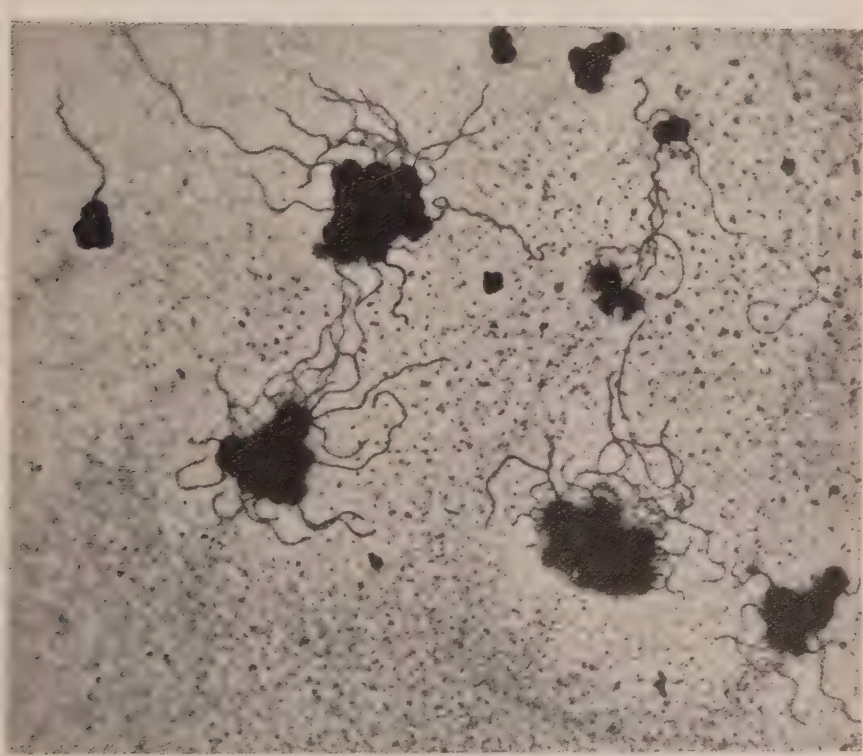


FIG. 1. — *Sarcina ureæ* Souche de la National Collection of Type Cultures, Coloration des cils par le procédé de Casares-Gil, modifié par S. Levenson. Grossissement 1.800. Photo Jeantet, Institut Pasteur.

chaînnettes de *Micrococcus* » mobiles, tandis que la mobilité des chaînettes comprenant 10 à 20 éléments de « *Strepto-Micrococcus* » serait rare. Toutefois, la description de ces microbes donnée par Billroth est insuffisante pour qu'on puisse se prononcer sur leur nature.

Flatzek [10] décrit, en 1919, un diplocoque lancéolé, prenant

le Gram, formant en bouillon également de courtes chaînettes et manifestant dans ce milieu, surtout en cultures obtenues à la température du laboratoire, une mobilité très nette. Ce microbe a été isolé des matières fécales humaines. Les formes en diplocoques aussi bien que les chaînettes étaient entourées d'une « couronne de nombreux et longs cils » ondulés. Lorsqu'il s'agissait de diplocoques, l'auteur a vu de 6 à 8 cils. Il parle de cils péritriches. Flatzek, qui considère ce microbe comme se rapprochant du *Str. acidi lactici*, l'a nommé *Bacterium libaviense*, en ajoutant que ce nom devrait, le cas échéant, être remplacé par celui de *Streptococcus libaviensis*.

Schieblich (1932) a isolé du fourrage vert 2 souches qui, sauf la présence de cils, étaient, du point de vue morphologique, identiques au *Str. acidi lactici* Grotenfeld. Cependant, en cultures jeunes en bouillon, ces cocci se sont montrés vivement et activement mobiles, aussi bien cultivés à 37° qu'à la température du laboratoire. L'auteur n'a jamais observé plus de 2 cils partant d'une cellule. Le plus souvent il s'agirait de cils polaires. En cultures plus âgées il n'y a que quelques individus mobiles. En bouillon alcalin, la culture pousse plus lentement et peu abondamment, les cocci sont plus petits et plus arrondis et la mobilité manque complètement ou presque complètement. Il a dénommé ses 2 souches mobiles *Streptococcus herbarum* n. sp. [25].

Henneberg (1934) [13], dans son manuel « Bakteriologische Molkereikontrolle » (« Contrôle Bactériologique de l'Industrie laitière »), signale également l'existence de streptocoques activement mobiles, tout en disant qu'on les trouve très rarement. Il n'indique pas les caractères de ces microbes.

Koblmüller (1935) a isolé 10 souches mobiles d'entérocoques dont il a fait une étude très approfondie [14]. Il a eu l'occasion d'étudier également les 2 souches de Schieblich (*Str. herbarum*). Toutes ces souches présentent les caractères essentiels des entérocoques.

Nous ne pouvons pas entrer ici dans tous les détails du travail remarquable de Koblmüller. Notons seulement les points les plus importants. D'après cet auteur, la réaction du milieu la plus favorable pour la recherche de la mobilité des souches étudiées par lui correspond à $\text{pH} = 6,8-6,6$. Par contre, en bouillon faiblement alcalin

(pH = 7,2-7,3) il ne trouve, en culture âgée de dix à douze heures, que peu d'éléments mobiles. La mobilité elle-même est, dans ces conditions, affaiblie. En milieu encore plus fortement alcalin, la mobilité est presque nulle. Nous insistons sur ce point car, comme nous le verrons plus loin, ces faits ne correspondent pas aux résultats que nous avons obtenus avec les souches étudiées par nous.

Les milieux solides seraient, d'après Koblmüller, plus favorables pour la mobilité que les milieux liquides. Disons en passant que Koblmüller se sert, pour la recherche de la mobilité, de préférence du micromanipulateur (« Plattenmanipulator ») de Koblmüller et Vierthaler [45] permettant d'effectuer les micromanipulations sur la surface des plaques de gélose.

L'addition de glucides est, d'après Koblmüller, inutile pour la recherche de la mobilité. L'addition de protéides (sérum, ascite) en quantité plus ou moins importante exerce une action inhibitrice sur la mobilité. Ce n'est pas le cas si ces substances sont bouillies. Ainsi, on observe une mobilité nette sur la gélose de Levinthal ou sur le sérum de Loeffler.

La température du laboratoire est plus favorable pour l'obtention de cultures mobiles que la température de l'étuve, le vieillissement des cultures se produisant beaucoup plus rapidement à 37° qu'à 22°.

Koblmüller a observé, le plus souvent, 1 à 2 cils partant d'une cellule, plus rarement 3 ou 4 cils. Quant à la disposition des cils, l'auteur suppose qu'il y a tantôt des cils polaires, tantôt des cils latéraux, mais il démontre, à l'aide de dessins schématiques, la difficulté de se prononcer à ce sujet.

En comparant ses 10 souches d'entérocoques mobiles (qu'il appelle aussi « Milchsäurestreptokokken », *Str. acidilactici* Grotenfeld) ainsi que les 2 souches de *Str. herbarum* de Schiebllich avec le *Str. libaviensis* de Flatzek, Koblmüller constate que ce dernier ne se distingue des autres souches que sur deux points : sa culture est nettement inhibée dans les conditions anaérobies et il donne sur gélose des colonies d'aspect particulier (après vingt-quatre heures Flatzek a observé des petites colonies rondes, surélevées, en gouttes de rosée ; après quarante-huit heures, les colonies ont 1 millimètre de diamètre, elles sont aplaties, la partie centrale, homogène, forme une concavité, entourée d'un bourrelet plus élevé, granulé ; au fur et à mesure que les colonies grandissent, la différence entre la partie centrale et la partie périphérique disparaît).

Ajoutons encore quelques détails donnés par Koblmüller : toutes ses souches, ainsi que celles de Schiebllich, sont thermorésistantes (trente minutes à 60°). Elles donnent un trouble homogène en bouillon. Elles poussent abondamment, avec trouble homogène, en bouillon additionné de 50 p. 100 de bile de bœuf. Toutes les souches dédoublent l'aesculoside. Le mannitol est fermenté par 9 souches sur 10 de Koblmüller ainsi que par les 2 souches de Schiebllich. Les deux souches de Schiebllich et deux de Koblmüller donnent, surtout sur sérum de Löffler et sur pomme de terre, des colonies jaunâtres.

Il nous paraît intéressant de signaler une observation inédite de Koblmüller qu'il a eu l'amabilité de nous commu-

niquer. Une des souches d'entérocoques mobiles isolée d'une souris et étudiée par ce chercheur, a donné, ensemencée sur gélose, deux sortes de colonies : les unes étaient constituées par des formes mobiles, les autres par des formes immobiles. Koblmüller a pratiqué alors des isolements à partir d'une cellule unique, et il a obtenu 2 souches différentes : l'une mobile, l'autre immobile. Ces souches se distinguaient, en outre, par certains caractères biochimiques. Observées pendant dix-huit mois (les souches ont été ensuite égarées), elles n'ont pas changé : l'une s'est montrée toujours mobile, l'autre toujours immobile.

Margaret Pownall (1935) [24] a décrit 4 souches d'entérocoques mobiles.

La réaction des milieux employés par cet auteur correspondait à $\text{pH} = 7,6$. Le milieu le plus favorable pour la manifestation de la mobilité serait le bouillon additionné de sérum inactivé (sérum de cheval, de lapin, de cobaye ou sérum humain). La mobilité serait le plus intense après six à huit heures d'incubation à 37° ; après dix-huit à vingt-quatre heures elle est faible, après une incubation encore plus prolongée elle est nulle. Les 4 souches produisent le dédoublement de l'aesculoside et la fermentation du mannitol ; elles résistent pendant vingt minutes au chauffage à 60° , mais ne supportent pas cette température pendant trente minutes. En bouillon, il se forme un trouble homogène sans dépôt. En bile pure ces germes poussent faiblement. Sur gélose au sang, il y a une aréole verte autour des colonies, le milieu s'éclaircissant ensuite. L'auteur a observé le plus souvent 1 seul cil partant d'un coccus ou d'un diplocoque, plus rarement 2 cils, mais il n'y avait jamais de cils aux deux pôles. La position des cils était toujours latérale.

Stölting (1935) a isolé, du fromage de Tilsit, 12 souches mobiles de streptocoques [26]. L'auteur les identifie comme des souches atypiques de *Str. bovis* se rapprochant du *Str. inulaceus*.

En bouillon non sucré, ces souches ne donnaient, après vingt-quatre heures, qu'une culture à peine visible ; le bouillon lactosé était, par contre, fortement troublé. Le mannitol était fermenté par 10 souches sur 12, l'aesculoside n'était dédoublé que par 2 souches. Quant à la thermorésistance, l'auteur indique que 2 souches ont été tuées par chauffage de trente minutes à 63° . La mobilité a été recherchée en cultures en bouillon lactosé additionné de craie, obtenues à 30° et à 37° après vingt-quatre heures d'incubation. En gardant ensuite les cultures à la température du laboratoire, l'auteur a pu constater la présence de quelques éléments encore mobiles après deux à quatre

jours. Par contre, en bouillon lactosé sans craie, l'auteur n'a observé qu'exceptionnellement, en cultures de vingt-quatre heures, une mobilité faible. Il n'a jamais observé plus de 2 cils partant d'une cellule. La position des cils était latérale.

RECHERCHES PERSONNELLES. — Nous avons eu l'occasion d'étudier 44 souches d'entérocoques, dont 3 se sont montrées mobiles.

Dans une publication antérieure nous avons déjà résumé très brièvement les résultats de nos recherches sur 43 de ces souches, dont 2 mobiles [19].

Deux de ces souches ont été isolées dans le laboratoire de M. Weinberg, à l'Institut Pasteur (une des souches provient d'un appendice, l'autre des fragments de l'utérus d'une vache atteinte de gangrène gazeuse ; cette dernière souche est désignée ici comme souche Vache f.). Nous devons les 42 autres souches à l'obligeance du Dr Kurt Meyer (Laboratoire de la fondation franco-américaine, Berck-Plage) ; ce sont en partie ses souches personnelles, en partie des souches provenant du laboratoire du Prof. K. Aoki (Sendai, Japon). Leur origine est différente : pus, sang, matières fécales, urine (pyélite).

Pour l'identification des entérocoques, nous nous sommes basé sur les travaux de Dible (1921) [7], de Weatherall et Dible (1929) [28] et surtout de K. Meyer (1936) [21]. A côté de l'aspect morphologique, les caractères les plus constants des entérocoques (*Str. faecalis*) sont les suivants : thermorésistance (trente minutes à 60°), résistance vis-à-vis de la bile, dédoublement de l'aesculoside (esculine), trouble homogène en bouillon. La fermentation du mannitol est aussi un caractère important, mais moins constant. Nous nous sommes servi également de la réaction de Violle (1935) [27], basée sur la résistance des entérocoques à l'action du ricinoléate de soude à 4 p. 1.000 pendant une heure. Toutefois, nous ne pouvons pas nous prononcer définitivement sur la valeur diagnostique de cette réaction (qui nous paraît cependant être importante), le nombre des souches de « vrais » streptocoques employées par nous à titre de témoins n'étant pas suffisant. Sur 44 souches étudiées, nous avons obtenu les résultats suivants : Thermo-résistance : 44 souches ; culture abondante en bouillon bilié

à 50 p. 100 : 44 souches ; dédoublement de l'aesculoside : 44 souches ; trouble homogène en bouillon : 43 souches ; fermentation du mannitol : 34 souches ; réaction de Violle positive : 43 souches.

Nous tenons à donner ici quelques précisions sur la composition de nos milieux de culture. Nous avons toujours employé (sauf pour la recherche du dédoublement de l'aesculoside) le bouillon Vf (Weinberg et Goy). Ce bouillon, à base de produits de digestion de viande et de foie de bœuf et destiné surtout aux anaérobies, est aussi un excellent milieu pour la culture des aérobies. Actuellement ce bouillon est préparé, dans le laboratoire de M. Weinberg, d'après un procédé nouveau : les panses de porc sont remplacées par la pepsine sèche du commerce. Les proportions de viande et de foie sont les suivantes : 4 kilogrammes de viande et 1 kilogramme de foie pour 20 litres d'eau ; on y ajoute la quantité nécessaire de pepsine qui varie suivant son titre (10 grammes de pepsine si le titre est de 500) ainsi que 200 cent. cubes de Hcl pur (voir Weinberg, Nativelle et Prévot, 1937 [29]). La gélose employée par nous est également préparée avec du bouillon Vf.

Pour la recherche du dédoublement de l'aesculoside, nous nous servons toujours du procédé de K. Meyer (1928) [20] : onensemence la souche à étudier dans du bouillon nutritif ordinaire additionné de 2 p. 1.000 d'aesculoside. Après une incubation de vingt-quatre à quarante-huit heures à 37°, on ajoute 1 goutte d'une solution très diluée (jaune clair) de chlorure ferrique. Si la réaction est positive, il se produit instantanément un noircissement intense.

Enfin, pour la recherche de la mobilité, nous examinons toujours nos cultures en goutte pendante. Nous étalons, tout autour de la concavité de la lame, une mince couche de glycérol sur laquelle nous appliquons la lamelle portant la goutte de culture. L'emploi du glycérol nous paraît plus commode que celui de la vaseline ou de la paraffine, parce qu'il est ensuite très facile de laver les lames.

Pour la coloration des cils, nous nous sommes toujours servi du procédé de Casares-Gil, modifié par nous (Levenson 1936) [18].

En étudiant ces 44 souches d'entérocoques, nous avons constaté que 3 souches (Lie, Shigeno 10 et Vache f.) sont mobiles et ciliées, tandis que les 41 autres souches, étudiées dans les mêmes conditions, ne manifestent aucune mobilité et ne possèdent pas de cils.

Les 3 souches mobiles sont, abstraction faite de leur mobilité, des souches typiques d'entérocoques ; elles présentent les caractères suivants :

Morphologie : diplocoques et chaînettes plus ou moins courtes. Les cellules sont, dans la plupart des cas, légèrement ovales. Ils prennent le Gram.

Cils : On en observe, en cultures jeunes, surtout sur des formes en diplocoques (fig. 2), mais aussi sur des courtes chaînettes. Dans la plupart des cas, nous n'avons vu que 1 à 2 cils partant d'une cellule, exceptionnellement jusqu'à 4, jamais davantage. Disons toutefois que les cils des entérocoques sont tellement fragiles (comme l'a fait remarquer déjà Koblmüller) qu'il nous paraît très difficile, sinon impossible, de nous prononcer d'une façon définitive sur le nombre maximum de cils. La disposition des cils est le plus souvent nette-

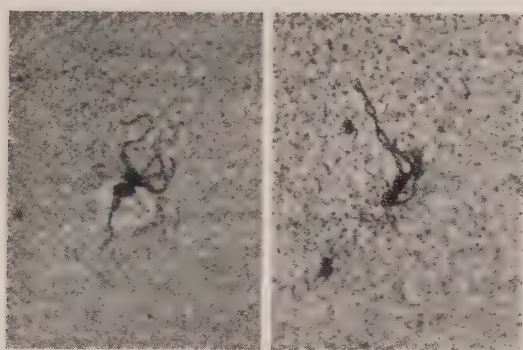


FIG. 2. — *Entérocoques mobiles*. Coloration des cils par le procédé de Casares-Gil, modifié par S. Levenson. Grossissement 1.800. Photo Jeantet, Institut Pasteur.

ment latérale ; parfois, on a l'impression de voir des cils polaires.

Caractères cultureux et biochimiques : Sur gélose, colonies qui ne se distinguent en rien des colonies typiques d'entérocoques. *Bouillon*, trouble homogène, dépôt plus ou moins visqueux. Le milieu s'éclaircit lentement et progressivement de haut en bas. *Bouillon bilité* à 50 p. 100 environ : culture très abondante. *Eau peptonée* à 2 p. 1.000 : culture peu abondante. Thermorésistance : trente minutes à 60°. Les 3 souches résistent à l'action du ricinoléate de soude à 4 p. 1.000 pendant une heure (réaction de Violle). Le mannitol est fermenté. L'aesculoside est dédoublé.

Rôle du pH du milieu : Nous avons examiné toutes les souches dans des milieux dont la réaction correspondait, d'une part à pH = 7,6 à 7,8 et à pH = 6,3 environ d'autre part.

Les souches Lie et Shigeno 10 se sont montrées mobiles aussi bien en milieux alcalins qu'en milieux légèrement acides.

Par contre, les milieux alcalins ($\text{pH} = 7,6$ à $7,8$) paraissent mieux convenir à la souche Vache f. Toutefois, en examinant une culture en bouillon légèrement acide ($\text{pH} = 6,5$ environ), obtenue à la température du laboratoire et âgée de seize à dix-huit heures, nous avons observé, chez cette souche, également quelques éléments activement mobiles, traversant rapidement le champ de vision. Dans l'eau de condensation de la gélose inclinée acide, il n'y a pas encore de culture après trois à quatre heures à 37° . Par contre, dans le même milieu acide nous avons observé des éléments nettement mobiles après dix-huit heures de séjour à la température du laboratoire.

Influence de la température : Les 3 souches sont mobiles dans des cultures obtenues à 37° et à la température du laboratoire. Cependant, la température du laboratoire est plus favorable du point de vue de la mobilité, le vieillissement des cultures se produisant beaucoup plus rapidement à 37° . Le comportement des 3 souches n'est pas le même en ce qui concerne l'influence de la température : ainsi, en étudiant les souches Lie et Shigeno 10, nous avons pu observer des éléments encore nettement mobiles dans des cultures de vingt-quatre heures en bouillon ($\text{pH} = 7,6$ à $7,8$) obtenues à l'étuve à 37° et gardées ensuite pendant quarante-huit heures à la température du laboratoire. La souche Vache f., cultivée à 37° en bouillon, était déjà immobile après seize à dix-huit heures. Dans des cultures du même âge, obtenues à la température du laboratoire, il y avait encore quelques éléments faiblement mobiles. En bouillon glucosé à 2 p. 1.000, cette souche s'est montrée encore très mobile après dix-huit à vingt-quatre heures à la température du laboratoire, tandis qu'en culture du même âge obtenue à 37° elle était déjà immobile ou bien ne contenait que quelques rares éléments faiblement mobiles. En bouillon lactosé additionné de craie (c'est dans ce milieu que Stölting constate le plus facilement la mobilité de ses souches) il y a, après seize à dix-huit heures à 37° , encore des éléments mobiles, mais on observe très nettement la prédominance des mouvements de rotation. Cultivée à la température du laboratoire dans le même milieu, cette

souche est encore très mobile après vingt-quatre heures et l'on observe alors nettement des mouvements de translation. Notons en passant un fait curieux : la souche Vache f., dont la mobilité est la plus difficile à constater, a été beaucoup plus récemment isolée que les souches Lie et Shigeno 10.

Il s'agit ici, comme nous l'avons dit plus haut, d'un vieillissement plus rapide des microbes à 37° qu'à la température du laboratoire, et non pas du phénomène observé par différents auteurs (Kossel et Overbeck [16], Weitzenberg [30], Paul Boquet [5]) chez le coccobacille de Malassez et Vignal (*B. pseudotuberculosis rodentium* A. Pfeiffer). En effet, ce microbe, mobile de 18° à 22°, serait absolument immobile et dépourvu de cils en cultures obtenues à 37°. (Toutefois, Arkwright [4] a observé une fois des éléments mobiles de ce microbe dans une culture obtenue à 37°).

Age des cultures : Au cours de notre exposé, nous avons déjà fourni quelques indications à ce sujet. D'autre part, nous avons eu l'occasion d'en parler, à propos d'autres microbes, dans des publications antérieures. Ici, nous voudrions insister sur la grande relativité de l'expression, employée très souvent, « cultures jeunes ». Une culture de trois à quatre heures du *B. bifementans* est jeune, une culture de huit heures du même microbe ne l'est plus, surtout du point de vue de la mobilité (Levenson [17]). Par contre, une culture de dix-huit heures du *B. proteus*, du *B. oedemaliens*, etc., est encore jeune. Il faut donc toujours préciser l'âge de la culture pour l'espèce microbienne donnée, parfois même pour la souche en question, et indiquer en même temps les conditions de culture (pH et composition du milieu, température).

DISCUSSION DES RÉSULTATS. — Si nous comparons les résultats de nos recherches que nous venons d'exposer, avec les résultats des autres auteurs, nous pouvons tout d'abord constater que, parmi les Streptococcées mobiles que l'on connaît jusqu'à présent, il y a sans aucun doute des entérocoques. Nous considérons comme entérocoques mobiles les 2 souches de Schieblich, les 10 souches de Koblmüller, les 4 souches de Pownall et les 3 souches que nous venons de décrire. Pour la souche de Flatzek (« *Str. libaviensis* ») nous sommes moins affirmatif, surtout à cause du fait que sa culture serait inhibée par les conditions anaérobies. Par contre, les souches mobiles décrites par Stölting paraissent en effet ne pas être des entérocoques (culture à peine visible en bouillon non sucré, dédoublement de l'aesculoside par 2 souches seulement sur 12).

Il y a certaines divergences entre nos résultats et ceux des autres auteurs, notamment de Schieblich et de Koblmüller,

surtout quant au pH du milieu le plus favorable pour la mobilité. Mais ceci peut provenir d'une différence individuelle des souches étudiées, en partie peut-être aussi de la composition différente des milieux.

Il nous paraît d'ailleurs inutile (et là nous sommes d'accord avec Koblmüller) de vouloir créer, pour ces formes mobiles, des noms d'espèces nouvelles. Nous les considérons (au moins pour le moment) comme des souches mobiles d'espèces microbiennes dont on ne connaissait, jusqu'à ces derniers temps, que des souches immobiles.

Sérologie. — Koblmüller [14] a préparé des sérums agglutinants avec ses souches. L'agglutination serait tantôt granuleuse, tantôt floconneuse. L'auteur n'a pas approfondi la question des types sérologiques, estimant insuffisant le nombre des souches mobiles connues jusqu'à présent.

Pownall [24] a également fait des recherches sérologiques sur les entérocoques mobiles. Le taux d'agglutination obtenu avec le même sérum serait le même pour les 4 souches isolées par cet auteur. La même constatation a été faite pour la fixation du complément. Les tentatives de cet auteur pour mettre en évidence l'antigène H n'ont pas donné de résultat.

Nous avons fait les constatations suivantes avec les souches étudiées par nous. Le sérum préparé avec la souche Vache f. donne le même taux d'agglutination avec la souche homologue et avec la souche hétérologue Shigeno 10. Ces deux souches mobiles appartiennent donc au même type sérologique.

La troisième souche mobile (souche Lie) n'est pas agglutinée par les sérums préparés avec les souches Vache f. et Shigeno 10. Par contre, elle est agglutinée par le sérum préparé avec la souche immobile 22 appartenant au type sérologique IV de Kurt Meyer.

CONCLUSIONS.

1° L'existence de souches mobiles d'entérocoques nous paraît être établie définitivement.

2° Il y a encore d'autres Streptococcées mobiles (souches mobiles et atypiques de *Str. bovis* décrites par Stölting).

3° Le nombre de cils que l'on a observés jusqu'à présent chez les entérocoques mobiles ainsi que chez les autres Strep-

tococcées mobiles est le plus souvent de 1 à 2, exceptionnellement jusqu'à 4.

4° Les souches mobiles étudiées par nous appartiennent à 2 types sérologiques différents.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ARKWRIGHT (J. A.). *Lancet*, **1**, 1927, p. 13.
- [2] BENECKE (W.). *Bau und Leben der Bakterien*, Leipzig, 1912.
- [3] BERGEY (D. H.). *Manual of Determinative Bacteriology*, 4^e édit., Baltimore, 1934.
- [4] BILLROTH (Th.). *Untersuchungen über die Vegetationsformen der Coccabacteria Septica, etc.*, Berlin, 1874 (cité d'après Koblmüller).
- [5] BOQUET (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 931.
- [6] BURCKHARDT (I. L.). *Arch. f. Hyg.*, **82**, 1914, p. 235-320.
- [7] DIBLE (J. H.). *Journ. of Path. a. Bact.*, **24**, 1921, p. 3.
- [8] ELLIS (D.). *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, **9**, 1902, p. 546.
- [9] ELLIS (D.). *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, **41**, 1903, p. 241.
- [10] FLATZEK (A.). *Zentralbl. f. Bakt.*, **82**, 1919, p. 234.
- [11] FRIED. Thèse de Sciences, Würzburg, 1902 (cité d'après Burckhardt).
- [12] GALLI-VALERIO (B.). *Zentralbl. f. Bakt.*, **47**, 1908, p. 177.
- [13] HENNEBERG (W.). *Bakteriologische Molkereikontrolle*, Berlin, 1934, p. 11 (cité d'après Koblmüller).
- [14] KOBLMÜLLER (L. O.). *Zentralbl. f. Bakt.*, **133**, 1935, p. 310.
- [15] KOBLMÜLLER (L. O.) et VIERTHALER (R. W.). *Zentralbl. f. Bakt.*, **129**, 1933, p. 438.
- [16] KOSSEL et OVERBECK. *Arbeit. a. d. k. Gesundheitsamt*, **18**, 1902, p. 114 (cité d'après Weitzenberg).
- [17] LEVENSON (S.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 221.
- [18] LEVENSON (S.). *Ces Annales*, **56**, 1936, p. 634.
- [19] LEVENSON (S.). *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 1937, p. 1270.
- [20] MEYER (K.). *Zentralbl. f. Bakt.*, **109**, 1928, p. 350.
- [21] MEYER (K.). *Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.-Krankh.*, **118**, 1936, p. 204.
- [22] MIGULA (W.). *System der Bakterien*, t. II, Iéna, 1900.
- [23] OMELIANSKY (V.). *Osnovi microbiologii* (en russe), 7^e édition posthume, par B. Issatchenko, Leningrad-Moscou, 1931.
- [24] POWNALL (Margaret). *The British Journ. of Exp. Path.*, **16**, 1935, p. 155.
- [25] SCHIEBLICH (M.). *Zentralbl. f. Bakt.*, **124**, 1932, p. 269.
- [26] STÖLTING (J.). Thèse de Sciences, Kiel, 1935.
- [27] VIOLLE (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 1042.
- [28] WEATHERALL (Cicely) et DIBLE (J. H.). *Journ. of Path. a. Bact.*, **32**, 1929, p. 413.
- [29] WEINBERG (M.), NATIVELLE (R.) et PRÉVOT (A. R.). *Les microbes anaérobies*, Masson, édit., Paris, 1937.
- [30] WEITZENBERG (R.). *Zentralbl. f. Bakt.*, **133**, 1935, p. 343.
- [31] ZETTNOW. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.-Krankh.*, **86**, 1918, p. 25.

ERRATA

Article Vassiliadis (Ces *Annales*, 53, 1937, p. 165) :

Page 165, 29^e ligne, *lire*, 1,5 pour 10, au lieu de 1,5 pour 100.

Article Marchoux, Chorine et Koechlin (Ces *Annales*, 59, 1937, p. 549) :

Page 559, à la fin du dernier paragraphe, *ajouter* : Nina Ermakova a trouvé dans les ganglions spinaux les mêmes lésions que Lù (*Intern. Journ. of Leprosy*, 4, p. 329).

Le Gérant : G. MASSON.